

ANALYSE
EINER $t(2;8)$ TRANSLOKATION
AM BEISPIEL
DER BURKITT-LYMPHOM-LINIE BL 64

Peter Hartl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554605_0004

ANALYSE EINER t(2;8) TRANSLOKATION AM BEISPIEL
DER BURKITT-LYMPHOM-LINIE BL 64

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von Peter Hartl

1. Berichterstatter: Prof.Dr.E.-L. Winnacker

2. Berichterstatter: Frau Prof.Dr.E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1984 bis Oktober 1986 unter Anleitung von Herrn Prof. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Herrn Prof. E.-L. Winnacker danke ich besonders für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Dr. M. Lipp möchte ich recht herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und für die Zusammenarbeit danken.

Mein Dank gilt Herrn Dr. H. Hameister, Ulm für die Durchführung der *in-situ*-Hybridisierungen an den BL 64 - Chromosomen.

Frl. H. Synovzik möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente danken.

Weiterhin möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, an dieser Stelle danken, besonders Herrn H. Kühnel und Herrn P. Heinrich für ihre Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Onkogene	1
1.2. Aktivierung zellulärer Onkogene	2
1.3. Burkitt-Lymphome	6
1.4. c- <u>myc</u>	8
1.5. Aufgabenstellung	10
2. Materialien	11
2.1. Zelllinien, Bakterien und Plasmide	11
2.2. Enzyme	11
2.3. Chemikalien und andere Materialien	12
2.4. Puffer, Medien und Lösungen	14
3. Methoden	16
3.1. Zellkultur	16
3.1.1. Vermehrung von Zellen in Suspensionskultur	16
3.1.2. Aufbewahren von Zelllinien	16
3.1.3. Isolierung von DNA aus Zellen	16
3.2. Transiente Expression des CAT-Gens	17
3.2.1. Transfektion von Zellen nach der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode	17
3.2.2. Transfektion von Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode	18
3.2.3. CAT-Aktivitätstest	19
3.3. Bakterienkultur	20
3.3.1. Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur	20
3.3.2. Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten	20
3.3.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	20
3.4. Vermehrung von Lambda-Phagen	21
3.4.1. Präparation von Bakterien zur Transformation	21
3.4.2. Titerbestimmung und Präparation von Stocklösungen	21
3.4.3. Isolierung von λ -Phagen-DNA	22

	Seite
3.4.4. Identifizierung rekombinanter Klone	23
3.4.5. Plaque-Reinigung	24
3.4.6. Schnellmethode zur Isolierung von λ -Phagen-DNA	24
3.5. Enzymatische Reaktionen an DNA	25
3.5.1. Konzentrierung von DNA	25
3.5.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	26
3.5.3. Phosphatasebehandlung	26
3.5.4. <i>in vitro</i> -Markierung von DNA mit α - ³² P-dCTP	27
3.5.5. Markierung von DNA durch 'Oligoprimering'	28
3.5.6. 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	29
3.5.7. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase	29
3.6. Charakterisierung von DNA	30
3.6.1. Trennung von DNA auf Agarosegelen	30
3.6.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
3.6.3. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter	31
3.6.4. Hybridisierung mit <i>in vitro</i> -markierten Proben	33
3.6.5. Hybridisierung mit Oligonukleotiden	34
3.7. Klonieren in Plasmide	35
3.7.1. Isolierung von Plasmiden	35
3.7.2. Vorbehandlung des Vektors	37
3.7.3. Vorbereiten der DNA-Fragmente	37
3.7.4. Transformationskompetente Bakterien	37
3.7.5. Transformation der Bakterien	38
3.7.6. Selektion und Identifizierung rekombinanter Plasmide	38
3.7.7. Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid DNA	39
3.8. Klonieren in M13-Phagen	40
3.8.1. Transformationskompetente Bakterien und Transformation	40
3.8.2. Schnellaufschlußmethode zur Identifizierung rekombinanter Phagen	41
3.8.3. Isolierung von M13 ss(+) -DNA	41

	Seite
3.9. Sequenzierung von DNA nach dem Dideoxyverfahren	42
3.9.1 Sequenzierung von M13 ss(+) -DNA	42
3.9.2. Sequenzierung doppelsträngiger DNA	44
3.9.3. Elektrophorese von Sequenzgelen	46
4. Ergebnisse	48
4.1. Partielle Duplikation des c- <u>myc</u> -Gens	48
4.1.1. Identifizierung einer Amplifikation des c- <u>myc</u> -Gens	48
4.1.2. Charakterisierung duplikationsspezifischer Phagen	50
4.1.3. Sequenzierung des Übergangs zur Duplikation	53
4.1.4. Identifizierung der c- <u>myc</u> -Duplikation als Polymorphismus	54
4.2. Vergleich der beiden c- <u>myc</u> -Allele aus BL 64	55
4.2.1. Sequenzanalyse des ersten Exons beider Allele	55
4.2.2. Aktivitätsvergleich der c- <u>myc</u> -Promotoren beider Allele	60
4.3. Einfluß des C κ -Enhancers auf die c- <u>myc</u> -Expression	62
4.3.1. Konstruktion der c- <u>myc</u> / CAT/C κ -Fusionsplasmide	63
4.3.2. CAT-Test der Plasmide in BL 64 -Zellen	64
4.4. Struktur des funktionellen κ -Immunglobulins	66
4.5. Analyse der BL 64 - Chromosomen	68
4.5.1. <i>In situ</i> -Hybridisierungen der translozierten Chromosomen	68
4.5.2. 'Southern-Blot'-Analyse von BL 64 - DNA mit J κ - und C κ - spezifischen Proben	70
4.5.3. Charakterisierung des 3'-c- <u>myc</u> Genbereichs	71
4.6. Analyse des Bruchpunktes auf Chromosom 8q ⁺	84
4.6.1. Eingrenzung des Bruchpunktes	84
4.6.2. Klonierung und Sequenzierung des Bruchpunktes	84

	Seite
4.7. Analyse des Bruchpunktes auf Chromosom 2p ⁺	86
4.7.1. Isolierung und Charakterisierung Jk ⁺ -spezifischer Lambda-Phagen	86
4.7.2. Eingrenzung des Bruchpunktes	88
4.7.3. Sequenzierung des reziproken Bruchpunktes	90
4.8. Analyse der Sequenzen beider Bruchpunkte	92
4.8.1. Vergleich der Sequenzen	92
4.8.2. Die Rolle der V-J-Rekombinationssignale bei der Entstehung der Translokation	94
5. Diskussion	96
5.1. Ein neuer Polymorphismus des c- <u>myc</u> Gens	96
5.2. Vergleich der beiden c- <u>myc</u> -Allele	98
5.3. Chromosomale Analyse von BL 64	100
5.4. Struktur und Mechanismus der Translokation in BL 64	102
6. Zusammenfassung	107
7. Literaturverzeichnis	108

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
g/l	Gramm pro Liter
HEPES	N-2Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
PBSD	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
pfu	Plaque-bildende Einheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

<u>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</u>	Seite	
Tab. 3.5.-1	Pufferbedingungen für Restriktionsenzyme	26
Tab. 3.9.-1	Mixe zur M13-DNA Sequenzierung mit ²³ P	43
Tab. 3.9.-2	Mixe zur M13-DNA Sequenzierung mit ³⁵ S	43
Tab. 3.9.-3	Mixe zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA	45
Tab. 4.2.-1	Transfektion der pmycCAT*P-Konstrukte in BL 64 - Zellen	62
Abb. 4.1.-1a	Southern-Blot Analyse von 184- und BL 64 - DNA mit einer 3'-c- <u>myc</u> -Probe	49
Abb. 4.1.-1b	Strukturen der Phagen 64/07 und 64/08	49
Abb. 4.1.-2	Strukturvergleich der Phagen 64/04 und 64/08	50
Abb. 4.1.-3	Subklonierungen aus 64/08	51
Abb. 4.1.-4	Lage des Duplikationsübergangs	51
Abb. 4.1.-5a	Spaltmuster von 64/06	52
Abb. 4.1.-5b	Autoradiographie von 64/06	52
Abb. 4.1.-5c	Struktur des Phagen 64/06	52
Abb. 4.1.-6	Sequenzvergleich des Übergangs zur Duplikation mit der Keimbahnsequenz des c- <u>myc</u>	53
Abb. 4.1.-7	Southern-Blot Analyse von DNA verschiedener Zelllinien mit einer 3'-c- <u>myc</u> -Probe	54
Abb. 4.2.-1	Klonierungsstrategie zur Sequenzierung des ersten Exons beider Allele	57
Abb. 4.2.-2	Sequenzgele der Punktmutationen im ersten Exon und Intron	58
Abb. 4.2.-3	Nachweis der Punktmutation an Position 2727 mit einem spezifischen Oligonukleotid	59
Abb. 4.2.-4	Ergebnis der Transfektionen der pmycCAT*P-Konstrukte	61
Abb. 4.3.-1	Struktur der CAT-Konstrukte und Ergebnis der Transfektion	65
Abb. 4.3.-2	Sequenzierungsschema des Vic-Genbereichs	67
Abb. 4.3.-3a	Promotorbereich des Vic-Gens	67

	Seite	
Abb. 4.3.-3b	V-J-Fusionsbereich mit verändertem J4-Gen	68
Abb. 4.5.-1	<i>in situ</i> -Hybridisierung der BL 64 - Chromosomen 8q ⁺ und 2p ⁻	69
Abb. 4.5.-2a	J κ -Hybridisierung von BL 64 - DNA	70
Abb. 4.5.-3	C α -Hybridisierung von BL 64 - DNA	70
Abb. 4.5.-4	Subklonierungsschema ausgehend von 64/04	72
Abb. 4.5.-5a	Spaltmuster der 64/15 - DNA	73
Abb. 4.5.-5b	Struktur der Phagen 64/04 und 64/15	73
Abb. 4.5.-6a	Subklonierungsschema ausgehend von 64/15	74
Abb. 4.5.-6b	Subklonierung von pH 235/1	75
Abb. 4.5.-6c	Subklonierung von pH 244/1	76
Abb. 4.5.-7	Southern-Blot-Analysen mit den Plasmiden pH 219/1 und pH 244/1	77
Abb. 4.5.-8a	Spaltmuster von 64/19	78
Abb. 4.5.-8b	Struktur der mit pH 235/1 isolierten Phagen im Vergleich mit 64/15	79
Abb. 4.5.-9	Subklonierungsschema ausgehend von 64/19	79
Abb. 4.5.-10a	Struktur der mit pH 264/1 isolierten Phagen im Vergleich mit 64/19	80
Abb. 4.5.-10b	Spaltmuster des Phagen 64/26	81
Abb. 4.5.-11	Southern-Blot-Analysen von BL 64 - DNA mit den Plasmiden pH 235/1, pH 264/1 und pH 267/1	82
Abb. 4.5.-12	Zusammenfassung des isolierten DNA-Bereichs	83
Abb. 4.6.-1	Subklonierung von pT 49	85
Abb. 4.6.-2	Subklonierungs- und Sequenzierungsschema des Bruchpunktes	85
Abb. 4.6.-3	Sequenz des Bruchpunktes im Vergleich mit der J-Keimbahnsequenz	86
Abb. 4.7.-1	Struktur des Phagen 64/09 im Vergleich zu 64/03	87
Abb. 4.7.-2	Struktur der mit der J κ -Probe isolierten Phagen	87
Abb. 4.7.-3	Subklonierungs- und Sequenzierungsschema von pH 208/1 ausgehend	88

	Seite
Abb. 4.7.-4	Southern-Blot-Analyse von BL 64 - und IARC 549 - DNA mit dem Plasmid pH 262/1
Abb. 4.7.-5	Sequenzierungsschema des reziproken Bruchpunktes
Abb. 4.7.-6	Sequenz des Bruchpunktes im Vergleich zur J-Keimbahnsequenz
Abb. 4.8.-1	Sequenzanalyse des Bruchpunktes auf Chromosom 8q ⁺
Abb. 4.8.-2	Sequenzanalyse des Bruchpunktes auf Chromosom 2p ⁻
Abb. 5.3.-1	Zusammenfassung des isolierten 3'-c-myc Genbereichs
Abb. 5.4.-1	Modell des Translokationsablaufes in BL 64

1. EINLEITUNG

1.1 Onkogene

Der Entdeckung des transformierenden Gens (v-src) des Rous Sarcoma Virus und der Identifizierung seines zellulären Homologen (c-src, Stehelin et al., 1976) folgten die Identifizierung und Isolierung weiterer transformierender Gene retroviralen Ursprungs und der entsprechenden homologen zellulären Gene. Der Zusammenhang zwischen ihnen konnte in einem Modell aufgezeigt werden (Swanstrom et al., 1983), das die Entstehung eines viralen Onkogens anhand seiner Transduktion durch das Retrovirus beschreibt. Die Funktion dieser viralen Onkogene liegt in der Transformation der vom Virus befallenen Zelle; für den Lebenszyklus der Retroviren haben diese Gene keine Bedeutung. Im Gegenteil, meist wird eines der drei essentiellen viralen Gene durch die Transduktion teilweise oder vollständig zerstört, sodaß ein intaktes Helfervirus für die Vermehrung dieser Viren notwendig ist.

Die Untersuchung weiterer Virusstämme führte in den letzten Jahren kaum noch zur Entdeckung neuer Onkogene, vielmehr wurden bereits bekannte in ähnlicher Struktur erneut isoliert (Coffin et al., 1981). Zusätzlich wurden neue Onkogene einerseits durch Transfektions-Experimente als transformierender Teil von Tumor-DNA bekannt, andererseits durch ihre Lokalisation in der Nähe von chromosomalen Bruchpunkten. Jedoch scheint die Anzahl der Onkogene insgesamt eng begrenzt zu sein.

Die Funktion der Onkogene in normalen Zellen ist noch weitgehend unbekannt. Ihre starke Konservierung während der Evolution und ihr ubiquitäres Auftreten, das von der Hefe bis zum Menschen reicht, zeigen, daß ihre Existenz für die Zellen von großer Bedeutung sein muß. Es konnte für einige Onkogene gezeigt werden, daß sie möglicherweise an der Regulierung des Zellwachstums beteiligt sind, da ihre Proteinprodukte eng mit Wachstumsfaktoren, beziehungsweise deren Rezeptoren verwandt oder identisch sind. Von anderen Onkogenen wird ein Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung vermutet; eine unterschiedliche Expression dieser Gruppe während verschiedener embryonaler Stadien, bzw. in unterschiedlichen

zerfallungsstadien, deuten dies zumindest an (Slamon und Cline, 1984). Allgemein lassen sich die Onkogene der Funktion ihrer Produkte nach in verschiedene Gruppen einteilen. Einige kodieren für Proteine, die im Kern lokalisiert wurden, andere für tyrosinspezifische Proteinkinasen, die in den Plasmamembranen verankert sind.

Die Mitwirkung zellulärer Onkogene bei der Entstehung von Tumoren ist in den Fällen gesichert, in denen sie durch retrovirale Transduktion aktiviert wurden. Zu dieser Aktivierung tragen neben der unmittelbaren Umgebung starker viraler Promotoren auch strukturelle Veränderungen bei. Die viralen Onkogene sind oftmals den zellulären gegenüber durch Punktmutationen verändert, oder es wurde nur ein Teil des zellulären Homologen transduziert. In anderen Fällen führt die Transduktion zu einer Fusionierung des Onkogens mit einem viralen Gen, die die Bildung eines Fusionsproteins ermöglicht.

1.2. Aktivierung zellulärer Onkogene

Andere Arten der Aktivierung zellulärer Onkogene, als die durch Transduktion von Retroviren, sind durch Insertion von Retroviren in das zelluläre Genom, Amplifikation, Mutation und Translokation dieser Gene gegeben. Viele der Retroviren enthalten keine Onkogene, sind aber trotzdem nach einer latenten Periode in der Lage Tumore zu verursachen. Experimentell wurde gefunden, daß das provirale Genom oft in der Nähe solcher zellulärer Onkogene integriert ist, die bereits als virale Onkogene bekannt waren. Dabei geraten diese Onkogene unter den Einfluß eines starken viralen Promotor- oder Enhancerelementes, das in der langen terminalen Repetition (LTR) des Retrovirus enthalten ist. Gut charakterisierte Beispiele dafür sind die Aktivierung von c-erbB (Fung et al., 1983), c-myc (Hayward et al., 1981; Payne et al., 1982; Fung et al., 1982) und c-myb (Shen-Ong et al., 1986).

In anderen Fällen wurden Onkogene erst entdeckt, weil sie wiederholt in der Umgebung proviraler Integrationsstellen identifiziert wurden. Um diesen Ansatz optimal ausnutzen zu können, sollte nur eine Kopie des retroviralen Genoms integriert sein. Durch Isolierung der an die Integrationsstelle angrenzenden DNA und ihrer

Verwendung als molekulare Sonde wurden andere Tumore darauf untersucht, ob Viren an der gleichen Stelle integriert sind. Auf diese Art wurden int-1 (Nusse und Varmus, 1982) und int-2 (Peters et al., 1983) an den Integrationsstellen des MMTV entdeckt, bei letzterem Beispiel gelang dies, obwohl mehr als eine Kopie des viralen Genoms im zellulären Genom integriert war. Im Fall von int-1 wird die Onkogen-Hypothese bestärkt durch die starke Konservierung dieses Gens während der Evolution. MMTV und MuLV scheinen bezüglich der Spezifität ihrer Integrationsstellen unter den Retroviren eine Ausnahme darzustellen, da bei den anderen Retroviren ähnliches nicht festgestellt werden konnte.

Die Amplifizierung von bestimmten Onkogenen wird in Tumoren häufig beobachtet (Marx, 1984). So wird zum Beispiel in vielen Neuroblastomlinien ein amplifiziertes N-myc Gen gefunden (Schwab et al., 1983), das c-myc Gen ist unter anderem in der Maustumorlinie SEWA (Schwab et al., 1985), in der menschlichen Tumorlinie HL 60 (Collins und Groudine, 1982) und in der Glioblastomlinie SF-188 (Trent et al., 1986) amplifiziert und wird jeweils erhöht exprimiert. Die Amplifikation führt in allen soweit untersuchten Fällen zu einer erhöhten Expression des betroffenen Gens. Die menschliche Tumorlinie A431 zeigt eine abnorm hohe Expression des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (Haigter et al., 1978), die auf einer Amplifikation des c-erbB Gens beruht (Ullrich et al., 1984; Libermann et al., 1985). Teilweise scheint die Amplifikation der Onkogene spezifisch für die Art und Aggressivität des Tumors zu sein, sodaß ein Einfluß zellulärer Onkogene auf die Progression eines Tumors angenommen werden muß (Brodeur, 1984). Die Erhöhung der Expression amplifizierter Onkogene muß nicht unbedingt auf einem 'Dosisseffekt' beruhen, oft findet man Mutationen in amplifizierten Genen, oder die Gene werden durch die Amplifikation aus ihrem normalen Umfeld gebracht, wobei wichtige regulatorische Sequenzen verloren gehen können.

Der Einfluß von Mutationen im kodierenden Bereich von Onkogenen auf ihre Wirkung ist am Beispiel der ras-Genfamilie gut untersucht. Zu dieser Genfamilie gehören c-Ha-ras1, c-Ki-ras2 und N-ras. Aufgrund großer Sequenzhomologie konnten auch in der Hefe entsprechende Gene, RAS1 und RAS2, identifiziert werden (De Feo-Jones et al., 1983). Aus vielen Tumoren unterschiedlichen Ursprungs konnten ras-Gene isoliert werden, die Punktmutationen aufwiesen. Die Mutationen betreffen fast ausschließlich Kodon 12, 59 und 61. Durch *in-vitro*-Rekombination von normalen und mutanten ras-Genen konnte die funktionelle Bedeutung dieser Mutationen bewiesen werden (Yuasa et al., 1984; Tabin et al., 1982; Capon et al., 1983). Das gehäufte Auftreten von Mutationen in diesen Kodons wird mit einem starken selektiven Druck durch das Ausarten der Zellen zu Tumorzellen erklärt (Varmus, 1984), schließt aber die Veränderung anderer Bereiche der ras-Gene nicht aus.

Das Auffinden von Punktmutationen in aktivierten ras-Genen aus verschiedenen Tumoren stimmt mit der Beobachtung überein, daß Umweltmutagene auch karzinogen wirken können. Die Mitwirkung dieser Mutationen an der Tumorgenese läßt sich durch chemische Induktion von Tumoren im Tierversuch nachweisen. Mit großer Reproduzierbarkeit lassen sich in diesen Tumoren Mutationen nachweisen, die das Kodon 12 betreffen. Es ist jedoch noch unklar, in welchem Umfang die Mutationen zur Tumorgenese beitragen, da Land et al., 1983 zeigten, daß neben einem aktivierten ras Gen mindestens ein weiterer Faktor notwendig ist, um *in-vivo* einen Tumor entstehen zu lassen. Studien an menschlichen Melanom- und Teratokarzinomlinien deuten auf eine Aktivierung des ras Gens durch Mutation als späten Schritt in der Entstehung des Tumors hin (Albino et al., 1984). Mit einem ähnlichen Ansatz der *in-vitro*-Rekombination des normalen Gens mit seiner zelltransformierenden Variante konnte anhand des neu-Onkogens gezeigt werden, daß das transformierende Potential des aktivierten Gens ebenfalls auf einer Punktmutation im kodierenden Bereich beruht (Bargmann et al., 1986). In diesem Fall scheint die Punktmutation den transmembranen Bereich des rezeptorähnlichen Proteins zu betreffen (Stern et al., 1986).

Chromosomale Veränderungen werden in Tumorzellen oftmals beobachtet, häufig sind diese Aberrationen spezifisch für eine bestimmte Tumorart. Im Philadelphia-Chromosom, dessen Auftreten eng mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) verbunden ist, wird das Onkogen c-abl von Chromosom 9 durch die Translokation mit einer bestimmten Region von Chromosom 22 verbunden (Groffen et al., 1984; Heisterkamp et al., 1983). Die Signifikanz dieser reziproken t(9;22) Translokation wird deutlich durch die hohe Spezifität des Bruchpunktes auf Chromosom 22, der in 17 von 19 untersuchten Fällen in der gleichen, 5kbp großen Region liegt (Groffen et al., 1984). Die Bedeutung dieses als bcr-1 bezeichneten Bereichs ist noch nicht klar, obwohl zumindest in einigen CML-Linien dieser Bereich transkribiert wird. Ebenfalls noch nicht geklärt ist der Einfluß der Translokation auf das c-abl Gen selbst, in einigen Fällen wird jedoch ein verändertes Transkript in erhöhter Menge beobachtet (Shtivelman et al., 1986).

In anderen lymphoiden Tumoren humanen Ursprungs sind ebenfalls reziproke Translokationen beschrieben worden, die hauptsächlich den Immunglobulinogenort der schweren Kette auf Chromosom 14 betreffen. Zech et al., 1984 analysierten eine intrachromosomale Translokation des Chromosoms 14, die mit einem T-Zell Tumor verknüpft ist. Durch diese Inversion wird zumindest in einem Fall (Baer et al., 1985) das konstante Gen des T-Zell Rezeptors mit einem variablen Immunglobulinogen der schweren Kette verknüpft. Aufgrund von t(11;14) und t(14;18) Translokationen (Tsujimoto et al., 1984a; Tsujimoto et al., 1984b) werden auf Chromosom 11 und auf Chromosom 18 jeweils im Bereich der Bruchpunkte die Onkogene bcl-1 (Erikson et al., 1984) b.z.w. bcl-2 postuliert (Tsujimoto, 1985). Ein weiteres Onkogen, das c-myc Gen, wird durch Translokation mit einem der Immunglobulinogenorte verbunden. Beispiele dafür wurden in Tumorzelllinien aus Maus (Cory et al., 1983; Crews et al., 1982), Ratte (Sumegi et al., 1983) und Mensch (Rowley, 1983) gefunden. Die entsprechenden Mausplasmazytome und Burkitt-Lymphome sind unter den Tumorarten, die eine spezifische Translokation aufweisen, am besten untersucht.

1.3. Burkitt-Lymphome

Burkitt-Lymphome sind Tumore von B-Zellen, die hauptsächlich bei afrikanischen Kindern in der Altersstufe von 4-16 Jahren gefunden werden. Seltener sind Fälle außerhalb Zentralafrikas (wie in Europa oder Amerika) und in anderen Altersstufen beschrieben worden. Die Tumore lassen sich von Linien der B-Lymphozyten ableiten, die für die Produktion der Immunglobuline verantwortlich sind. Alle Burkitt-Lymphome, mit der einzigen Ausnahme einer atypischen Linie, tragen als chromosomalen Marker eine von drei, für Burkitt-Lymphome charakteristischen Translokationen. In allen der bis jetzt untersuchten Fälle ist von diesen spezifischen Translokation das Chromosom 8 betroffen. Der Bruchpunkt liegt immer in der Bande 8q24, in der auch das Onkogen c-myc von Zytogenetikern durch *in-situ*-Hybridisierung lokalisiert worden ist. Der reziproke Bruchpunkt liegt jeweils an einem der drei, in B-Zellen normalerweise aktiven Immunglobulinengenorte. In 75% der untersuchten Fälle wurde eine t(8;14) Translokation nachgewiesen, bei der das c-myc Gen mit dem Genort der schweren Kette verknüpft wird, 16% weisen t(8;22) und 9% t(2;8) Translokationen auf (Croce, 1985a). Bei diesen sogenannten varianten Translokationen verbleibt das c-myc Gen auf Chromosom 8 (Erikson et al., 1983), ein Teil des Gens der leichten Kette λ von Chromosom 22 bzw. der leichten Kette κ von Chromosom 2 wird an das Chromosom 8 transloziert.

Die Translokation bewirkt in allen Fällen, daß das c-myc Gen gegenüber normalen B-Zellen eine höhere RNA-Menge aufweist, obwohl sich die Bruchpunkte der t(8;14) einerseits und t(2;8) bzw. t(8;22) Translokationen andererseits in – vom c-myc Gen aus betrachtet – entgegengesetzten Richtungen befinden. Die t(8;14) Translokationen betreffen hauptsächlich den 5'-Bereich des c-myc Gens, häufig ist sogar das c-myc Gen selbst davon betroffen. In den varianten Translokationen liegt der Bruchpunkt, soweit dies bekannt ist, immer in 3'-Richtung des c-myc Gens. Bei den Translokationen bleiben das zweite und dritte Exon immer intakt, während das nichtkodierende erste Exon oft teilweise oder ganz durch die t(8;14) Translokation vom kodierenden Teil des Gens getrennt wird. Es scheint für die Entstehung der Burkitt-Lymphome bedeutend zu sein, daß der kodierende Bereich und mit ihm das Protein erhalten bleibt. Die große Variabilität der Bruchpunkte schließt einen

einfachen und einheitlichen Mechanismus der Aktivierung von *c-myc* durch die Translokation aus. So ist die Aktivierung durch einen einzelnen Promotor oder Enhancer eine Ausnahme (Hayday et al., 1984), obwohl Experimente mit transgenen Tieren die Effizienz dieser Aktivierung zeigen (Adams et al., 1985; Leder et al., 1986). Dagegen scheint ein durch die Translokation hervorgerufener, aktiver Status des Chromatinbereichs, in dem das *c-myc* Gen liegt, eine Voraussetzung der Aktivierung zu sein (Perry, 1983).

Die entscheidende Bedeutung der Translokation für die Pathogenese der Burkitt-Lymphome wird durch einen Vergleich mit der Entwicklung von Plasmacytomen der Maus unterstützt. Molekularbiologische Analysen von Mausplasmacytomen ergaben deutliche Homologien zu den Translokationen der Burkitt-Lymphome, in den Plasmacytomen wird ebenfalls das Onkogen *c-myc* in einen der Immunglobulinengenorte transloziert. Obwohl diese Homologie erstaunlich groß ist, sind doch deutliche Unterschiede zwischen den betroffenen Zelltypen vorhanden. Plasmacytome lassen sich von reifen Zellen der Maus ableiten, Burkitt-Lymphome entstehen jedoch in einem relativ frühen Stadium der B-Zelle. In den jeweils der anderen Spezies entsprechenden Tumoren konnte bis jetzt keine dieser typischen Translokationen gefunden werden.

Neben den Translokationen werden noch andere, für die Pathogenese der Burkitt-Lymphome wichtige Faktoren diskutiert. Seroepidemiologische Studien zeigten, daß 97% der afrikanischen Patienten mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert sind. Das EBV ist ein Herpesvirus, das im allgemeinen in B-Zellen in einem nicht lytischen Zyklus vermehrt wird. Es konnte gezeigt werden, daß in B-Zellen regelmäßig drei Bereiche des EBV-Genoms (LT-1, -2 und -3) transkribiert werden. Das Produkt der LT-1 Region, ein DNA-bindendes Protein mit dem relativen Molekulargewicht von 82 000, das als EBNA-2 bezeichnet wird, ist für den ersten Schritt verantwortlich, der zu einer Immortalisierung der infizierten B-Zellen führt, denn LT-1 defekte Viren sind dazu nicht in der Lage (Übersicht: Klein und Klein, 1985). Die Beteiligung der EBV-Infektion an der Pathogenese der Burkitt-Lymphome besteht wahrscheinlich in einem erhöhten Translokationsrisiko durch die Verlängerung der Lebensdauer der infizierten Zellen, verbunden mit einer Immunsuppression von T-Zellen.

Diese wird in den endemischen Gebieten Afrikas durch eine chronische Malariainfektion hervorgerufen. Unterstützt wird die Hypothese einer Mitwirkung der Immunsuppression durch das Auftreten von Burkitt-Lymphomen in EBV positiven AIDS-Patienten (Klein und Klein, 1985). Diese Burkitt-Lymphome enthalten ebenfalls die oben erwähnten, charakteristischen Translokationen.

Es ist fraglich, inwieweit die Aktivierung zusätzlicher Onkogene an der Entstehung der Burkitt-Lymphome beteiligt ist. So konnte bis jetzt eine Aktivierung von B-lym (Diamond et al., 1983) nur im Labor der Entdecker dieses Onkogens gezeigt werden, anderen Arbeitsgruppen war es nicht möglich diese Resultate zu reproduzieren (Devine, 1986). Die Aktivierung von c-ras durch die typischen Mutationen (s. 1.1.), die in einigen Burkitt-Lymphomen nachgewiesen wurde, müßte durch einen neuen Mechanismus zu der Entwicklung der Lymphome beitragen, denn von mutanten ras Genen wird angenommen, daß sie Fibroblasten durch Induktion eines von der Verankerung unabhängigen Wachstums transformieren, B-Zellen zeigen jedoch grundsätzlich diese Eigenschaft.

1.4. c-myc

Das Onkogen c-myc, dessen Aktivierung als wesentlicher Beitrag zur Entstehung der Burkitt-Lymphome angenommen wird, ist das zelluläre Homologe (Sheiness und Bishop, 1979) zum transformierenden Gen des Avian-Myelocytomatosis-Virus MC 29. Es konnte daneben in weiteren Retroviren nachgewiesen werden, die Huhn und Katze infizieren (Coffin et al., 1981; Neil et al., 1984; Levy et al., 1984). Das c-myc Gen ist unter den Spezies weit verbreitet, selbst in Drosophila wurden homologe Sequenzen durch Hybridisierung nachgewiesen (Shilo und Weinberg, 1981), die Sequenzen der c-myc Gene aus Huhn (Watson et al., 1983; Shih et al., 1984), Maus (Bernard et al., 1983) und Mensch (Gazin et al., 1984) sind bekannt. N-myc (Schwab et al., 1983) und L-myc (Nau et al., 1985) sind weitere Mitglieder der myc-Genfamilie und wurden aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu c-myc identifiziert.

Die *c-myc* Gene des Menschen, der Maus und des Huhns bestehen aus drei Exons, von denen das erste nicht kodierend ist, das zweite und das dritte Exon kodieren für ein Protein, das im Zellkern lokalisiert ist (Hann et al., 1983). Das Protein bindet mit großer Affinität an DNA, aber nicht sequenzspezifisch (Watt et al., 1985). Das erste Exon trägt zur Destabilisierung der *c-myc* RNA bei, denn die sehr kurze Halbwertszeit der RNA von 10-15 Minuten (Dani et al., 1984) ist um den Faktor 5 verlängert, wenn dieses Exon fehlt (Piechaczik et al., 1985); die Translationsrate ist jedoch unabhängig von der nicht-kodierenden 5'-Region (Butnick et al., 1985). Eine posttranskriptionelle Regulation scheint für diese kurze Halbwertszeit verantwortlich zu sein (Blanchard et al., 1985; Dani et al., 1985).

Die ursprüngliche Annahme, die Expression des *c-myc* Gens sei mit dem Zellzyklus reguliert, erwies sich als falsch. Sowohl die Menge an RNA (Thompson et al., 1985) als auch an Protein (Hann et al., 1985) ist unabhängig vom Zellzyklus einer sich teilenden Zelle. Die posttranskriptionelle Kontrolle der *c-myc* RNA ist jedoch mit der terminalen Differenzierung von Zellen eng korreliert. So können Friend-Maus-Erythroleukämiezellen durch DMSO zur Differenzierung veranlaßt werden. Mit Beginn des Differenzierungsschrittes tritt eine zweiphasige Regulation der *c-myc* RNA auf (Lachman und Skoultschi, 1984). Zunächst fällt die Menge der RNA ab, steigt in der G₁-Phase der Zelle dann aber wieder an. Die Differenzierung der Zellen kann durch eine konstante, deregulierte Expression des *c-myc* Gens unterdrückt werden (Prochownik und Kukowska, 1986; Dimitrovsky et al., 1986). Eine ähnliche Beobachtung wurde am System differenzierender hematopoetischer Zellen beschrieben (Resnitzky et al., 1986), in dem ein Zusammenhang zwischen Wachstumsstopp der Zellen, Differenzierung und Suppression der *c-myc* RNA festgestellt wurde. Faktoren, die diese Regulation bewirken sind noch unbekannt, eine Autoregulation durch das *c-myc* Protein wird ebenfalls diskutiert.

Da in vielen Burkitt-Lymphomen nur das translozierte Allel transkribiert wird, wurde angenommen, daß, verursacht durch die Translokation, eine Autoregulation dieses Allels nicht mehr möglich ist. Aber die Expression eines translozierten c-myc Gens unterdrückt in Hybriden eines Burkitt-Lymphoms mit einer lymphoblastoiden Linie (LCL) nicht die Expression des normalen c-myc Gens der LCL, sodaß das Modell der Autoregulation nicht aufrecht erhalten werden kann (Croce et al., 1985b)

1.5. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die strukturellen Veränderungen des c-myc Gens in der Zelllinie BL 64 aufzuklären. Dazu sollten durch Klonierung und teilweiser Sequenzierung des veränderten Bereichs sowohl Art und Umfang, als auch durch Vergleich mit anderen Zelllinien die Herkunft der Strukturänderung untersucht werden. Ein Vergleich der beiden c-myc Allele bezüglich ihrer Struktur und ihrer Aktivität, sowie die Charakterisierung des 3'-c-myc Genbereichs sollten die Auswirkung der Translokation auf das davon betroffene c-myc Gen klären. Die t(2,8) Translokation der Zelllinie BL 64 sollte durch Klonieren und Sequenzieren der beiden Bruchpunkte untersucht werden.

Dies geschieht um einerseits einen Einblick auf den Ablauf von varianten Translokationen in Burkitt-Lymphomen zu gewinnen, andererseits um die Auswirkung der Translokation auf die davon betroffenen Genabschnitte festzustellen. Die Kenntnis solcher Faktoren ist für ein Verständnis der Tumorgenese Voraussetzung, zusätzlich führen diese Kenntnisse langfristig zu einer Aufklärung komplexer Abläufe in eukaryotischen Zellen, wie zum Beispiel Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung.

2. MATERIALIEN

2.1. Zelllinien, Bakterien und Plasmide

Die Linien BL 64, IARC 549, EW 12, IARC 316 und IARC 184 wurden von G. Lenoir, Lyon erhalten.

Die Bakterienstämme E.coli HB 101, JM 83 und JM 103 sowie die Plasmide pUC 12, pUC 18, M 13 mp10 (RF) und M13 mp11 (RF) wurden aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Winnacker bereitgestellt.

Der Bakterienstamm K 803 sowie die Plasmide pKc 1,8 Sac I und pCk 0,5 Eco RI waren ein Geschenk von G.W. Bornkamm, Freiburg.

2.2. Enzyme und Chemikalien

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach; Bethesda Research Laboratories GmbH, New Isenburg und Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen.

Andere Enzyme

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Lysozym; alkalische Phosphatase; DNA-Polymerase I; DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment); RNase A.

New England Biolabs, Schwalbach:

T4 DNA-Ligase; T4 Polynukleotidkinase.

E. Merck AG, Darmstadt:

Proteinase K aus Pilzen.

2.3. Chemikalien und andere Materialien

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig:

γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mMol); α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mMol);

α - ^{35}S -thioATP (650 Ci/mMol); Multiprime DNA Labelling System.

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, New Jersey, USA:

Cäsiumchlorid; Glycerol.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Adenosin-5'-triphosphat; Chloramphenicol.

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Tryptic-Soy-Broth; Yeast-Extract.

Flow-Laboratories, Bonn:

Kälberserum (newborn und foetal).

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Chloroform; Formamid.

Kodak Limited:

Röntgenfilme XAR5, X-Omat S.

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumperoxodisulfat; Borsäure; Bromphenolblau; 1-Butanol; Chloroform;

Dimethylformamid; Dimethylsulfoxid; Essigsäure; Ethanol; Ethidiumbromid;

Ethylendinitrioloessigsäure (EDTA); Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumacetat;

Kaliumchlorid; Magnesiumchlorid; Magnesiumsulfat; Natriumacetat; Natriumchlorid;

Natriumcitrat; Natriumdihydrogenphosphat; Natriumdodecylsulfat (SDS); Phenol;

Polyethylenglycol (6000); Tetramethylethyldiamin (TEMED); Triton-X-100;

Xylencyanol.

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Petrischalen, Zellkulturflaschen.

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

2'-Desoxyribonukleotid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2',3'-Dideoxyribonukleotid-triphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP); Ficoll 400; Sephadex G50, fine.

C. Roth, Karlsruhe:

Dithiothreitol (DTT).

Schleicher und Schuell, Dassel:

DEAE-Cellulose-Membran, NA-45; Nitrocellulosefilter, BA-85.

Serva, Heidelberg:

Acrylamid; Harnstoff; 2-Mercaptoethanol; N,N'-Methylbisacrylamid; Polyvinylpyrrolidon (PVP); Visking-Dialysesschläuche.

Sigma Chemie, München:

Agarose Typ VII; Ampicillin; 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal); Rinderserumalbumin; tRNA aus Hefe; Tetracyclin; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris).

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:

3 MM-Papier; Anionenaustauscher DE-52.

Zinsser, Frankfurt:

Quickszint 501.

2.4. Puffer, Medien und LösungenBBL-Medium:

10 g Tryptic-Soy-Broth
5 g NaCl

10xDenhardt's:

0,2 % Rinderserumalbumin
0,2 % Ficoll 400
0,2 % Polyvinylpyrrolidon 360

LB-Medium (1 l):

10 g Trypton
5 g Yeast-Extract
5 g NaCl

2xNET (1 l):

0,3 M NaCl
30 mM Tris/HCl* $\text{pH} 8,3$
2 mM EDTA

CIA:

24 Vol Chloroform
1 Vol iso-Amylalkohol

Hybridisierungsmix (1 l):

50 % Formamid
50 mM Pipes ($\text{pH} 6,5$)
5 x SSC
400 mg Hefe tRNA
5 x Denhardt's

Minimalmedium (1 l):

0,5 g K_2HPO_4
4,5 g KH_2PO_4
1 g $(\text{NH})_2\text{SO}_4$
0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
5 μg Thiamin/HCl
2 g Glucose
0,5 g Natriumcitrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$

NZCYM (1 l):

10 g NZ-Amin
5 g NaCl
5 g Yeast-Extract
2 g $\text{MgSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
1 g Casamino-säuren

Polymerasepuffer:

60 mM NaCl
 50 mM Tris/HCl* pH 7,5
 7 mM MgCl_2
 7 mM DTT

20xSSC:

3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat

SM-Medium:

50 ml Tris/HCl* pH 7,5
 5,8 g NaCl
 2 g MgCl_2
 1 g Gelatine
 950 ml H_2O

Stoppuffer:

10 % Ficoll 400
 0,2 % Bromphenolblau
 50 mM EDTA

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl* pH 8,0
 1 mM EDTA

TY-Medium:

8 g Trypton
 5 g Yeast-Extract
 5 g NaCl

3. METHODEN

3.1. Zellkultur

3.1.1. Vermehrung von Zellen in Suspensionskultur

BL 64- und IARC 549-Zellen wurden in RPMI-Medium (+10% FKS) in einem CO₂-Brutschrank bei 37° C vermehrt. Waren die Zellen dicht genug gewachsen, so wurde das Volumen der Kultur durch Zugabe frischen, auf 37° C vorgewärmten Mediums verdoppelt. Bei einem Gesamtvolumen von 60 ml wurde die Kultur entweder aufgeteilt und entsprechend weitervermehrt, oder es wurden 50 ml der Kultur zur Gewinnung von DNA verwendet; die restlichen 10 ml wurden durch Zugabe von 5 ml Medium weitervermehrt. Bei normalem Wachstum der Zellen mußte nach jeweils 3-5 Tagen frisches Medium zugegeben werden.

3.1.2. Aufbewahren von Zelllinien

Die Zellen wurden aus 50 ml der Zellsuspension in einer Heraeus-Tischzentrifuge pelletiert (15 min, 1000 rpm, 4° C), der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem FKS (+10% DMSO) resuspendiert, in 1 ml Portionen aufgeteilt und sofort bei -80° C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur weiteren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Tiefgefrorene Zellen wurden weitervermehrt, indem sie, nach möglichst schnellem Auftauen, in 10 ml vorgewärmtes Medium pipettiert wurden.

3.1.3. Isolierung von DNA aus Zellen

50 ml einer dicht genug gewachsenen Suspensionskultur wurden in einer Heraeus-Tischzentrifuge (10 min, 1500 rpm, 4° C) abzentrifugiert und in 5 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde mit 2.5 ml Lysisbuffer und 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und anschließend 1-3 Stunden bei 37° C

inkubiert. Auf dieser Stufe wurde die Lösung eingefroren, falls die DNA nicht sofort isoliert wurde.

Zur Isolierung der DNA wurde die Lösung dreimal mit einem gleichen Volumen Phenol und zur Entfernung des Phenols zweimal mit einem gleichen Volumen CIA ausgeschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (10 min, 1500 rpm, 4° C). Die obere, wäßrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Die wäßrige Phase wurde mit 0.1 Volumen Natriumacetat versetzt und nach gutem Durchmischen mit einem gleichen Volumen iso-Propanol überschichtet. Durch langsames Verrühren der Phasengrenze wurde die DNA auf eine Pasteurpipette aufgewickelt, deren Ende zugeschmolzen und hakenförmig aufgebogen worden war. Nach leichtem Trocknen an der Luft wurde die DNA mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend an Luft getrocknet. Durch leichtes Bewegen der Pipette in TE-Puffer (pH 8.0) wurde die DNA wieder abgelöst. Um die DNA vollständig zu lösen wurde sie 24 Stunden bei 4° C aufbewahrt; der Lösungsprozess wurde teilweise durch kurze Inkubation (5-10 min) bei 68° C beschleunigt. Danach wurde die Konzentration durch Messen der OD_{260} ($1 OD_{260} \equiv 50 \mu g$ DNA) bestimmt. Die DNA wurde als genügend rein angesehen, falls das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zwischen 1.8 und 2.0 lag. Aus 50 ml Suspensionskultur wurden üblicherweise, je nach Zelldichte, 300-500 μg DNA gewonnen.

3.2. Transiente Expression des CAT-Gens

3.2.1. Transfektion von Zellen nach der $Ca_3(PO_4)_2$ -Methode

Die Transfektion erfolgte in ca. 50% konfluenten Petrischalen ($\varnothing$ 9 cm). Zwei Stunden vor Beginn der Transfektion wurde das Medium der Platten gegen neues Medium (+ 10% FKS) ausgetauscht. Je 2 μg und 10 μg der CAT-Plasmid-DNA wurden mit pUC 12 - DNA auf 20 μg Gesamtmenge aufgefüllt, das Endvolumen von

0,5 ml wurde mit TE-Puffer (pH 7,0) eingestellt. Die Komponenten wurden in folgender Reihenfolge zusammengegeben und unter Vermeidung von Scherkräften miteinander vermischt:

- a) TE-Puffer
- b) DNA
- c) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - Lösung (2 M)

die Endkonzentration an $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ war 125 mM. Diese Lösung wurde in HEPES-Puffer unter leichtem Vermischen getropft und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Niederschlag wurde im Lichtmikroskop auf seine kristalline Struktur hin untersucht, die möglichst fein sein sollte. Von dem Präzipitat wurden 0,5 ml, d.h. 10 µg DNA auf eine Platte gegeben. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit dem Niederschlag im Mikroskop überprüft und anschließend einem Glycerinschock ausgesetzt.

Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, wobei restliches Medium nach Schrägstellen der Platten möglichst vollständig entfernt wurde. Auf jede Platte wurden 1 ml Glycerinlösung (20% Glycerin in Hepes-Puffer) so verteilt, daß alle Zellen bedeckt waren. Die Platten wurden drei Minuten bei 37 °C im Brutschrank und anschließend eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit je 5 ml Dulbecco-Medium (ohne Serum) gespült wurden. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit Dulbecco-Medium (5% FKS) versetzt und bei 37 °C weitervermehrt. Nach 44 Stunden wurde der Proteinextrakt angefertigt (3.2.3.).

3.2.2. Transfektion von Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode

Diese Methode wurde bei Zellen angewandt, die in Suspensionskultur wuchsen. Um die Transfektionsexperimente zu normieren wurde die Zellzahl der Kulturen bestimmt, indem von einem verdünnten Aliquot der Kulturen nach Abzentrifugieren der Zellen (7 min, 1100 rpm, 4 °C) und Resuspendieren in RPMI-Medium (+10% FKS) die Zellzahl bestimmt wurde. 1×10^7 Zellen wurden in 0,5 ml RPMI-Medium zu 0,5 ml vorbereiteter DNA-Lösung (RPMI-Medium, 500 µg DEAE-Dextran, DNA) gegeben, damit vermischt und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Unterschiedliche Mengen der CAT-Plasmid-DNA wurden mit pUC 12 - DNA versetzt, sodaß eine

Gesamtmenge von 15 µg DNA bei jeder Transfektion eingesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1100 rpm, 4 °C) und in 0,5 ml Glycerin-Lösung (20% Glycerin; 25 mM HEPES* pH 7,08; 140 mM NaCl) resuspendiert, für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend sofort mit 10 ml RPMI-Medium versetzt und abzentrifugiert (2 min, 1100 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden in 1 ml RPMI/HEPES-Puffer (+ 50 U Heparin) aufgenommen, mit weiteren 1 ml RPMI-Medium versetzt und abzentrifugiert (3 min, 1700 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden in 5 ml RPMI-Medium (10% FKS) resuspendiert und in Kulturflaschen mit 10 ml dieses Mediums weitervermehrt.

3.2.3. CAT-Aktivitätstest

Die Zellen wurden 44 Stunden nach Transfektion geerntet, in 150 µl Tris/HCl-Puffer (pH 7,8) resuspendiert und zweimal je 5 Sekunden lang beschallt, wobei die Zellen auf Eis gehalten wurden. Die zellulären Reste wurden abzentrifugiert und von 3 µl des Überstandes wurde der Proteingehalt bestimmt. Für den Test wurden 250-500 µg Protein eingesetzt, das Volumen wurde mit Tris-Puffer auf 150 µl eingestellt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 25 µl Acetyl-CoA und 1,5 µl ^{14}C -Chloramphenicol 1 Stunde bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte zweimal mit je 400 µl Ethylacetat extrahiert, wobei die Phasen durch Zentrifugation getrennt wurden. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Entfernung des Ethylacetats im Vakuum getrocknet. Die trockenen Proben wurden in 20 µl Ethylacetat aufgenommen und auf Merck-Dünnschichtplatten aufgetragen. Nach dem vollständigen Eintrocknen der aufgetragenen Proben wurde die Chromatographie in abgeschlossenen Kammern bei einer Laufzeit von 55 Minuten durchgeführt, als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform/Methanol (95:5).

3.3. Bakterienkultur

3.3.1. Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur

Je nach Bedarf wurde autoklaviertes LB-Medium mit Antibiotikum (50 mg/l Ampicillin oder 12.5 mg/l Tetracyclin) versetzt. Das bei 37° C vorgewärmte Medium wurde bei langsam wachsenden Bakterien mit einer 1:25 Verdünnung, sonst mit einer 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden unter Schütteln bei 37° C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0.8 - 1.0 erreicht war. Nach Zusatz von 170 mg/l Chloramphenicol wurde die Bakterienkultur über Nacht geschüttelt, danach wurden die Bakterien zur Plasmidisolierung weiterverwendet.

3.3.2. Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten

Zur Herstellung der Platten wurde BBL-Medium mit Bacto-Agar (15 g/l) verwendet. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 55-60° C abgekühlt, bevor - je nach Art der Bakterien - 50 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Tetracyclin zugesetzt und das Medium in Petrischalen (Nunc, Ø 93 mm) gegossen wurde. Die Platten wurden bei Raumtemperatur bis zum Erstarren abgekühlt, und bei 4° C maximal 4 Wochen aufbewahrt.

3.3.3. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin (50%) versetzt und bei -80° C eingefroren. Davon wurde bei Bedarf, nach unvollständigem Auftauen, mit einer Impföse ein Inokulum auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert. Eine Einzelkolonie dieser Platte wurde zum Animpfen einer 5 ml Übernachtskultur verwendet.

3.4. Vermehrung von Lambda-Phagen

3.4.1. Präparation von Bakterien zur Transformation

100 ml eines autoklavierten LB-Mediums wurden mit einer Einzelkolonie des E.coli-Stammes K 803 angeimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37° C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation in einer Heraeus-Tischzentrifuge (20 min, 2500 rpm, 4° C) geerntet und in 25 ml autoklavierten SM-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4° C aufbewahrt und maximal drei Wochen verwendet.

3.4.2. Titerbestimmung und Präparation von Stocklösungen

Durch eine Reihenverdünnung wurden jeweils 10 µl einer Verdünnungsstufe 10fach weiterverdünt. Je nach der zu erwartenden Konzentration der Phagen wurden aus den Verdünnungsbereichen 10^{-3} – 10^{-7} je 10 µl der Suspension entnommen, zu 90 µl einer Infektionskultur pipettiert und schnell damit vermischt. Die infizierten Bakterien wurden 20 Minuten bei 37° C unter Schütteln inkubiert, bevor sie nach Zugabe von 3 ml warmer (55° C) Top-Agarose auf warme (37° C) BBL-Platten gegossen wurden. Zur gleichmäßigen Verteilung der infizierten Bakterien wurden die Platten mehrmals leicht geschüttelt. Nach Erstarren der Top-Agarose bei Raumtemperatur wurden die Platten über Nacht bei 37° C inkubiert. Durch Auszählen der Plaques bei geeigneten Verdünnungsstufen wurde der Titer errechnet. Zur Herstellung einer Phagenstocklösung wurden 90 µl einer Infektionskultur mit 10^5 pfu einer Phagensuspension infiziert und ausplattiert (s.o.). Nach vollständiger Lyse der Bakterien wurde die Platte mit 4 ml SM-Medium (3.4.1.) überschichtet und mindestens 4 Stunden bei 4° C aufbewahrt. Danach wurde das SM-Medium mit einer Pipette abgenommen, die Platte mit 1 ml SM-Medium nachgespült und von den vereinigten SM-Lösungen der Titer bestimmt. Die Stocklösungen wurden mit 50 ml Chloroform versetzt und bei 4° C aufbewahrt. Normalerweise enthielten die Stocklösungen 10^9 – 10^{11} pfu/ml.

3.4.3. Isolierung von λ -Phagen-DNA

Die Phagen-DNA wurde in ausreichender Menge nach einer Methode von F.R.Blattner et al., 1977 und T.Maniatis et al., 1978 gewonnen. Von 100 ml einer Übernachtskultur (E.coli K 803) wurde die OD₆₀₀ gemessen und daraus die Zahl der Bakterien errechnet ($1 \text{ OD}_{600} \equiv 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$). Zweimal je 10^{10} Zellen wurden in einer Heraeus Tischzentrifuge abzentrifugiert (20 min, 2500 rpm, 4° C) und in je 5ml SM-Medium (3.4.1.) resuspendiert. Die beiden Infektionskulturen wurden nach Infektion mit je 10^8 pfu der Phagensuspension 20 Minuten bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Jede der beiden Suspensionen wurde danach zu 1l, bei 37° C vorgewärmten NZCYM-Medium gegeben. Eine deutliche Lysis der Kulturen war nach 14 Stunden Inkubation bei 37° C unter heftigem Schütteln (300 rpm) zu erkennen. Durch Zugabe von 20 ml Chloroform/l Kultur und weiterem Schütteln (30 min, 37° C) wurde eine Lysis der restlichen, bereits vorgeschädigten Bakterien erreicht.

Zu der bei Raumtemperatur (RT) abgekühlten Kultur wurden 58,5 g NaCl/l Kultur gegeben und unter Rühren gelöst. Nachdem diese Suspension 1,5 Stunden bei 0° C auf Eis inkubiert worden war, wurden die bakteriellen Reste durch Zentrifugation in einem Sorvall GSA-Rotor (10 min, 8000 rpm, 4° C) entfernt. Der Überstand wurde mit PEG 6000, das unter Rühren bei RT gelöst wurde, bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) versetzt und weitere 3-4 Stunden bei 0° C auf Eis inkubiert. Die mit PEG 6000 gefällten Phagen wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall GSA-Rotor (10 min, 9000 rpm, 4° C) geerntet und in insgesamt 12 ml SM-Medium pro Liter Kultur resuspendiert.

Nach Zugabe eines gleichen Volumen Chloroforms wurde die Suspension stark geschüttelt. Die organische Phase und das PEG wurden von der wässrigen Phase, in der sich die Phagen befanden, durch Zentrifugation in einer Heraeus - Tischzentrifuge (10 min, 1500 rpm, 4° C) abgetrennt. Die obere, wässrige Phase wurde mit einer Pipette abgenommen, mit 0,75g CsCl/ml Überstand versetzt und in einem Sorvall TV865-Rotor zentrifugiert (4 h, 47000 rpm, 18° C). Die gut sichtbaren, bläulich schimmernden Banden wurden durch seitliches Punktieren

abgezogen, vereinigt und zur Entfernung des CsCl zweimal je 30–50 Minuten gegen 4 Liter Puffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl* pH 8,0; 10 mM MgCl_2) dialysiert

Die dialysierte Phagensuspension wurde mit 12,5 μl Proteinase K (10 mg/ml) und 100 μl EDTA (0,5 M) versetzt, das Volumen mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser auf 2,5 ml aufgefüllt und 1 Stunde bei 65° C inkubiert. Die Lösung wurde dreimal mit Phenol und anschließend zweimal mit CIA ausgeschüttelt. Die Phasen wurden jeweils durch Zentrifugation (10 min, 1500 rpm, 4° C) getrennt. Nach Zugabe von 0,1 Vol Natriumacetat (3 M) wurde die wäßrige Phase mit einem gleichen Volumen iso-Propanol überschichtet und die DNA durch Vermischen der Phasengrenze mit einer Pasteurpipette wie in 3.1.3. beschrieben isoliert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messen der OD_{260} bestimmt ($1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \mu\text{g/ml}$). Aus zwei Liter Kultur wurden normalerweise 700–800 μg Phagen-DNA gewonnen.

3.4.4. Identifizierung rekombinanter Klone

Aus λ -Genbanken wurden bestimmte rekombinante Phagen durch Hybridisierung mit einer geeigneten DNA-Sonde isoliert. Bei jedem Vorgang wurden 1×10^6 pfu der Genbank zu je 5×10^4 pfu mit je 400 μl einer Infektionskultur auf 20 BBL-Platten ($\varnothing$ 135 mm) mit 7 ml Top-Agarose ausplattiert (3.4.2.). Nitrocellulosefilter ($\varnothing$ 132 mm; Schleicher und Schuell) wurden an den Rändern mit einem Kugelschreiber markiert und nach dem Äquilibrieren in 0,5 M NaCl an Luft getrocknet, bevor sie noch leicht feucht auf die BBL-Platten gelegt wurden. Es wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen zwischen Filter und Platte befanden. An drei Stellen im Zentrum des Filters wurde mit einer Nadel durch Filter und Agar gestochen, um die Lage der Filter auf der Platte festzuhalten, zusätzlich wurden die Randmarkierungen der Filter auf die Petrischale übertragen. Nach 1–2 Minuten wurden die Filter abgenommen, 1–2 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), anschließend 1–2 Minuten in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl* pH 5,0; 0,9 M NaCl) und danach ebenso lange in 2xSSC gelegt, bevor sie auf Whatman 3MM Papier an Luft getrocknet wurden. Die Filter wurden 4 Stunden bei 80° C inkubiert, um die DNA auf den Filtern zu fixieren. Vorhybridisierung und Hybridisierung verliefen analog 3.6.4..

3.4.5. Plaque-Reinigung

Die Phagen, deren DNA bei der Hybridisierung ein positives Signal ergab, wurden – nach Bestimmung ihrer Position durch Vergleich des Röntgenfilms mit den Markierungen der Petrischale – mit einer abgeschnittenen 200 µl Gilson Pipettenspitze aus dem Agar ausgestochen und in 500 µl SM-Medium (3.4.1) pipettiert. Nach gründlichem Vermischen wurde wie beschrieben (3.4.2) der Titer bestimmt; je 2×10^3 und 2×10^2 pfu der Lösung wurden erneut auf einer BBL-Platte ($\varnothing$ 135 mm) ausplattiert. Da die gesuchten Phagen noch mit anderen verunreinigt waren, wurde das Selektions- (3.4.4.) und Reinigungsverfahren solange wiederholt, bis von einer Platte nur noch positive Signale erhalten wurden. Von jeweils einem dieser positiven Phagen wurde eine Stocklösung angelegt und sein Genotyp durch Charakterisierung seiner DNA festgelegt, die normalerweise nach der Schnellaufschlußmethode isoliert wurde.

3.4.6. Schnellmethode zur Isolierung von λ -Phagen-DNA

Das Verfahren zur schnellen Isolierung von Phagen-DNA wurde zuerst von P. Leder et al., 1977 beschrieben. 250 µl einer Lösung, die einen isolierten, ausgestochenen Phagen enthielt, wurde mit 20 µl einer Infektionskultur vermischt und 20 Minuten unter Schütteln bei 37° C inkubiert, bevor 4 ml NZCYM-Medium zugegeben wurden und die Kultur über Nacht weiter bei 37° C geschüttelt wurde.

Am nächsten Tag wurden zur vollständigen Lysis 100 µl Chloroform zugegeben und die Kultur wurde weitere 15 Minuten bei 37° C geschüttelt. Die bakteriellen Überreste wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall SS34-Rotor (10 min, 8000 rpm, 4° C) vom Lysat abgetrennt, das vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß abgegossen wurde, bevor RNase A und DNase I zu einer jeweiligen Endkonzentration von 1 µg/ml Lysat zugesetzt wurden. Nach Inkubation dieser Lösung (1 h, 37° C) wurden die Phagen durch Zugabe eines gleichen Volumen SM-Mediums (20% PEG 6000; 2 M NaCl) und Inkubation auf Eis (1 h) gefällt. Die Phagen wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall SS34-Rotor (20 min, 10000 rpm, 4° C) geerntet. Nach Abgießen des Überstandes wurde das

Reaktionsgefäß in gestürzter Position auf ein Papiertuch gestellt, Reste des Überstandes wurden mit einem Papiertuch aus den Röhrchen aufgesogen.

Zur Entfernung des PEG und etwaiger bakterieller Überstände wurde das Sediment in 500 µl SM-Medium resuspendiert und nach gründlichem Durchmischen in einer Tischkühlzentrifuge erneut pelletiert (2 min, 8000 rpm, 4° C). Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 5 µl SDS-Lösung (10%) und 5 µl EDTA-Lösung (0,5 M) versetzt und 15 Minuten bei 65° C inkubiert. Die Lösung wurde einmal mit Phenol und zweimal mit CIA extrahiert, wobei die wässrige Phase jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde; die Trennung der Phasen erfolgte in einer Eppendorfzentrifuge. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit einem gleichen Volumen iso-Propanol versetzt, gründlich vermischt und bei -80° C ca. 20 Minuten lang gefällt. Die DNA wurde nach Auftauen der Lösung bei Raumtemperatur abzentrifugiert (15 min, 15000 rpm, 4° C), an Luft getrocknet und mit Ethanol (70%) gewaschen. Die DNA wurde erneut an Luft getrocknet, bevor sie in 60 µl TE-Puffer aufgenommen wurde. Jeweils 5 µl dieser Lösung wurden mit 1 µg RNase A versetzt und zur Charakterisierung der DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen inkubiert.

3.5. Enzymatische Reaktionen an DNA

3.5.1. Konzentrierung von DNA

Waren DNA-Lösungen für enzymatische Reaktionen zu verdünnt, so wurde die DNA mit Ethanol gefällt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer wieder gelöst. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Vol Natriumacetat (3 M) und 2 Vol Ethanol (abs.) versetzt, gut durchmischt und für mindestens 30 Minuten bei -80° C inkubiert. Die so gefällte DNA wurde in einer Tischkühlzentrifuge präzipitiert (20 min, 14000 rpm, -15° C), mit 1 ml eiskalten Ethanol (70%) gewaschen und an Luft leicht getrocknet, bevor sie in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst wurde.

3.5.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung wurde die DNA üblicherweise in Konzentrationen von 5 µg/ml bis zu 400 mg/ml eingesetzt und mit entsprechenden 10xPuffern auf die benötigten Salzbedingungen eingestellt. Die Puffer wurden gemäß den Angaben der Enzymhersteller angesetzt, ihre Zusammensetzung ist in Tabelle 3.5.-1. dargestellt.

Enzyme	Tris (pH)	MgCl	NaCl	KCl	DTT	BSA (µg/ml)	β-Mercapto- ethanol
Bam HI ¹	6 mM (7,9)	6 mM	150 mM	—	—	100	—
Bgl II ²	10 mM (7,4)	10 mM	100 mM	—	—	100	10 mM
Eco RI	100 mM (7,5)	5 mM	50 mM	—	—	100	—
Hinc II	10 mM (7,4)	7 mM	60 mM	—	1 mM	100	—
Hind III ³	50 mM (8,0)	10 mM	50 mM	—	—	100	—
Hpa I	10 mM (7,4)	10 mM	—	20 mM	1 mM	100	—
Sac I ⁴	10 mM (7,5)	10 mM	—	—	1 mM	—	7 mM
Sma I	10 mM (8,0)	7 mM	—	20 mM	—	—	—
Xba I ⁵	6 mM (7,9)	6 mM	50 mM	—	—	100	—

1; auch für Sal I, Xho I; 2; auch für Pst I; 3; auch für Eco RV;

4; auch für Kpn I; 5; auch für Alu I, Hae III, Rsa I, Sau 3a1;

Tab. 3.5.-1: Pufferbedingungen für Restriktionsenzyme

Die Spaltungen wurden bei der angegebenen Temperatur mit einem oder mehreren Enzymen in einer Konzentration von 1–10 U/µg DNA durchgeführt. Hatten bei einer Mehrfachspaltung die Enzyme unterschiedliche Pufferbedingungen, so wurde nacheinander gespalten, mit der niedrigsten Salzkonzentration beginnend. Nach einer Spaltdauer von üblicherweise 60 Minuten – für genomische DNA bis zu 16 Stunden – wurde 0,1 Volumen Stopppuffer (10% Ficoll 400, 0,2% Bromphenolblau, 50 mM EDTA) zugesetzt. Danach wurde der Spaltansatz entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet, oder bei -20° C eingefroren.

3.5.3. Phosphatasebehandlung

5'-Phosphatreste wurden abgespalten, um in Ligasereaktionen eine intramolekulare Verknüpfung der Vektorenden zu verhindern. Dazu wurde nach Beendigung der

Restriktionsenzymspaltung mit 20xRAP-Puffer (0,8 M Tris/HCl*pH 8,0; 0,1 M $MgCl_2$; 2 mM $ZnCl_2$) die Salzkonzentration eingestellt, und die DNA 60 Minuten mit 1 U/ μ g DNA der alkalischen Phosphatase bei 37° C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz 15 Minuten bei 68° C inkubiert, bevor das Enzym durch Extrahieren mit Phenol und CIA entfernt wurde. Nach der Extraktion wurde die DNA mit Ethanol (abs.) gefällt (3.5.1.) und in TE-Puffer aufgenommen.

3.5.4. In-vitro-Markierung von DNA mit α - ^{32}P -dCTP

Gemäß einer Methode von P.W.J. Rigby et al., 1977 ließen sich durch gleichzeitige Einwirkung von DNase I und DNA-Polymerase I einzelne Nukleotide einer doppelsträngigen DNA durch radioaktive α - ^{32}P -Desoxynukleotide ersetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde nur α - ^{32}P -dCTP radioaktiv eingesetzt, die anderen Nukleotide wurden dem Reaktionsgemisch in nichtradioaktiver Form zugefügt. Für eine einzelne Markierung wurden 1 μ g DNA und 30-120 μ Ci α - ^{32}P -dCTP in einem maximalen Volumen von 40 μ l eingesetzt. Im einzelnen enthielt der Reaktionsansatz:

1	μ g	DNA
0,2	ng	DNase I
3-8	U	DNA-Polymerase I
0,1	Vol	10xTriphosphatpuffer

Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz 45-60 Minuten bei 16° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 0° C und sofortiger Zugabe von 10 μ l EDTA (0,5 M) gestoppt.

Die nicht eingebauten Triphosphate wurden von der markierten DNA durch Filtration über eine Sephadex G 50 (fine) Säule abgetrennt. Routinemäßig wurde dazu eine kleine Pasteurpipette mit einem kleinen Stopfen aus sterilisiertem Kleenexpapier abgedichtet und mit autoklaviertem, in TE-Puffer (pH 8,0) äquilibriertem Sephadex G 50 (fine) bis zum Knick gefüllt. Die Säule wurde 2-3 mal mit je 1,5 ml des gleichen Puffers äquilibriert, danach wurde das

Reaktionsgemisch aufgetragen. Das Reaktionsgefäß wurde mit 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) nachgespült und die DNA in 120 µl Fraktionen eluiert. 410 µl wurden anfangs gemeinsam aufgefangen, danach jede Fraktion einzeln. Mit einem Handmonitor wurden die Fraktionen ermittelt, die markierte DNA enthielten, normalerweise waren das die Fraktionen 3–5. Zur Kontrolle der Reaktion sowie der Trennung wurde solange eluiert, bis die Triphosphate mit einem Handmonitor durch Erscheinen eines zweiten Peaks gemessen werden konnten (ungefähr ab Fraktion 9). Fraktionen, die markierte DNA enthielten wurden vereinigt, 1 µl entnommen in 10 ml Quicksint (Zinsser) pipettiert und der Gehalt an Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt. Üblicherweise wurde eine spezifische Aktivität von $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cpm/µg DNA erhalten.

Triphosphatpuffer:

70 mM Tris/HCl * pH 8.0;

10 mM $MgCl_2$;

1 mM DTT;

20 µM dNTP (N = A, G, T, dCTP wird in radioaktiver Form zugesetzt)

3.5.5. Markierung von DNA durch 'Oligoprimering'

Eine weitere effiziente Möglichkeit, radioaktiv markierte DNA-Proben herzustellen, bietet das Verfahren des 'Oligoprimerings' von A. Feinberg und B. Vogelstein, 1983 und 1984, bei dem unter Verwendung von α - ^{32}P -markierten Nukleotiden durch Klenow-Polymerase radioaktiv markierte DNA anhand eines Templates gebildet wird.

Im einzelnen wurde gemäß dem Protokoll verfahren, das dem Reaktionskit der Amersham Buchler GmbH beilag, der in der vorliegenden Arbeit ausschließlich verwendet wurde. Isolierte DNA-Fragmente (3.6.2.) wurden in TE-Puffer zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml gelöst, jeweils 10 ng wurden pro Reaktionsansatz verwendet. Die DNA-Lösung wurde mit 18 µl bidestilliertem Wasser versetzt und in einem gut verschlossenen Reaktionsgefäß 2 Minuten bei 95° C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu der denaturierten DNA wurden nacheinander 11 µl Multiprimepuffer, 4 µl BSA-Lösung, 50 µCi ($\approx$ 5 µl) α - ^{32}P -dCTP und 2 µl

Klenow-Polymerase gegeben. Die Lösung wurde durch Pipettieren vorsichtig vermischt und die Reaktion bei Raumtemperatur drei Stunden durchgeführt. Der Multiprimerpuffer enthielt neben den Salzen noch die restlichen drei, nichtradioaktiven Nukleotide sowie als Primer ein Oligonukleotidgemisch aller möglichen 6mere (N)₆. Dadurch wurde erreicht, daß die Klenow-Polymerase, nach statistischem Hybridisieren dieser Oligonukleotide an die beiden Einzelstränge der DNA-Fragmente, einen radioaktiv markierten Gegenstrang synthetisierte. Die Reaktion wurde beendet, indem der Reaktionsansatz 2 Minuten bei 95° C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt wurde. Die radioaktiv markierten DNA-Stränge wurden von den nichteingebauten Nukleotiden und von kürzeren Oligonukleotiden über eine Sephadex G50 (fine) Säule abgetrennt (3.5.4.).

3.5.6. 5'- Endmarkierung von Oligonukleotiden

Die 5'- Hydroxylgruppen der Oligonukleotide wurden durch Polynukleotidkinase mit γ -³²P-dATP markiert. Die Lösung wurde auf die Salzkonzentration mit 0,1 Volumen eines zehnfach konzentrierten Kinasepuffers (0,5 M Tris/HCl* pH 9,5; 0,1 M MgCl₂; 50 mM DTT; 50% Glyzerin) und auf eine ATP-Konzentration eingestellt, die fünfmal so hoch war. Die Reaktion fand 30 Minuten bei 37° C statt und wurde durch Zugabe von 1 μ l EDTA (0,5 M) gestoppt. Das nicht eingebaute γ -³²P-dATP wurde über eine DE 52 (Whatman) Anionenaustauschersäule von den Oligonukleotiden abgetrennt, nachdem der Reaktionsansatz mit TE-Puffer auf 50 μ l verdünnt worden war. Mit 0,2 M NaCl in TE-Puffer wurde das ATP durch Zentrifugation eluiert, während die Oligonukleotide an der Säule gebunden blieben und anschließend mit 0,5 M NaCl in TE durch erneute Zentrifugation abgelöst wurden. Als Säule diente eine 1 ml Plastikspritze (Terumo: Tuberkulin), die mit Glaswatte abgedichtet und mit 0,5 ml des Säulenmaterials gefüllt worden war. Die Oligonukleotide wurden anschließend direkt als Hybridisierungsprobe verwendet.

3.5.7. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Gereinigte DNA-Fragmente (3.6.2.) wurden mit den Vektormolekülen durch T4-DNA-Ligase verknüpft, bevor mit dem Ansatz Bakterien transformiert wurden.

Üblicherweise wurden 25–100 ng Vektor und die Fragmente in einem molaren Verhältnis von 1:1 in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit einigen Einheiten der T4-Ligase ligiert. Die Salzbedingungen wurden mit 10xLigasepuffer eingestellt, die Reaktion wurde 14–24 Stunden bei 16° C durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde unverdünnt zur Transformation verwendet.

3.6. Charakterisierung von DNA

3.6.1. Trennung von DNA auf Agarosegelen

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet:

0,6% bei genomischer DNA und Fragmenten der Größe 0,6–24 kbp;

1% für 0,3–5 kbp;

1,6% für 0,1–1 kbp.

Die Agarose wurde in Tris-Acetat-Laufpuffer mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) im Mikrowellenherd aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60–70° C in vorbereitete Apparaturen gegossen. Die Auftragstaschen wurden durch Verwendung unterschiedlicher Kämme hergestellt.

Nach genügend langem Gellieren des Agarosegels bei Raumtemperatur (mindestens eine Stunde) wurde die DNA aufgetragen und in einem Spannungsgradienten von ca. 5V/cm aufgetrennt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) in einer Durchlichtapparatur konnte eine Mindestmenge an DNA von 10 ng, bei Minigelen (BRL: Modell H6) 5 ng, als fluoreszierende Bande sichtbar gemacht werden. Zur quantitativen Analyse wurden die Gele auf einer Durchlichtapparatur mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines vorgesetzten Rotfilters fotografiert (Film: Polaroid Typ 107). Sollte die DNA anschließend auf einen Nitrozellulosefilter übertragen werden, so wurde ein Längenmaßstab mitfotografiert.

3.6.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten bestimmte DNA-Fragmente kloniert werden, so wurden sie nach einer Restriktionsenzymspaltung über Agarosegele von anderen Fragmenten abgetrennt und nach einem Verfahren von Winberg und Hammarskjöld, 1980 isoliert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit langwelligem UV-Licht in einer Auflichtapparatur bestrahlt. In das Gel wurde direkt – in Laufrichtung – vor die zu isolierende Bande ein Schnitt mit einem Skalpell gesetzt. In den Einschnitt wurde eine vorbehandelte DEAE-Cellulose-Membran (Schleicher und Schuell, NA-45) gesteckt, an die bei weiterer Elektrophorese die DNA gebunden wurde.

Unter langwelligem UV-Licht war die DNA als rötlich- fluoreszierende Bande sichtbar, die überstehende Membran wurde ringsum möglichst knapp abgeschnitten. Die zurechtgeschnittene Membran wurde in einem Eppendorfgefäß mit 250 µl NET-Hochsalzpuffer bedeckt und zum Ablösen der DNA 1–3 Stunden bei 68° C inkubiert. Nach Abpipettieren des Puffers wurde die Membran mit weiteren 50 µl des gleichen Puffers gespült. Die vereinigten DNA-haltigen Lösungen wurden mit 900 µl n-Butanol (H₂O gesättigt) zur Entfernung des Ethidiumbromids ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation in einer Eppendorfsentrifuge getrennt. Die obere, organische Phase wurde verworfen. Die DNA wurde nach Zugabe von 2,5 Vol Ethanol (abs.) 30 Minuten bei –80° C gefällt und danach in einer Tischkühlzentrifuge pelletiert (20 min, 15000 rpm, –20° C). Nach Abgießen des Ethanols wurde die DNA leicht an Luft getrocknet, in 90 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und mit 3 M Natriumacetat erneut präzipitiert (3.6.!). Die in TE-Puffer gelöste DNA wurde für Ligasereaktionen oder Restriktionsenzymspaltungen verwendet.

3.6.3. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter

Die DNA wurde entweder nach dem von E.Southern, 1975 und 1980 beschriebenen Verfahren oder durch bidirektionellen Transfer an Nitrocellulosefilter gebunden.

Nach Spaltung der DNA durch Restriktionsenzyme und Auftrennen der Fragmente durch Gelelektrophorese wurde das Agarosegel 3 Minuten in 0,1 n HCl gelegt, anschließend mit Wasser kurz abgespült, bevor es 1 Stunde im Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) leicht geschüttelt wurde. Das Gel wurde erneut mit Wasser abgespült und eine Stunde im Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl* pH 5,0; 0,9 M NaCl) geschüttelt. Es wurde jeweils darauf geachtet, daß das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war.

Auf einen Rost wurden mehrere Streifen Whatman 3MM Papier so gelegt, daß sie durch den Rost hindurch in ein Vorratsgefäß tauchten, das mit 20xSSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat) gefüllt war. Darüber wurden zwei Bogen 3MM Papier in der Größe des Agarosegels gelegt und mit 20xSSC befeuchtet, bevor das Agarosegel darauf gelegt wurde. Auf das Agarosegel wurde ein in 20xSSC äquilibrierter Nitrocellulosefilter gleicher Größe gelegt und an den Rändern mit 5 cm breiten Plastikstreifen so abgedeckt, daß ca. 3-5 mm des Filters bedeckt waren. Dies sollte einen Kurzschluß durch seitliches Vorbeifließen des SSC verhindern. Darauf wurden zwei in 20xSSC getränkte Bogen 3MM Papier gleicher Größe gelegt und mit einem 10 cm hohen Stapel Papierhandtücher überschichtet.

Dieser Aufbau wurde zunächst für ca. 30-60 Minuten nur mit einer Glasplatte beschwert (bis das Gel genügend geschrumpft war), bevor darauf ein Gewicht von 1-2 kg gestellt wurde. Nach 18 Stunden wurde die feuchte Schicht durch trockene Papierhandtücher ersetzt. Die Auftragsstellen der DNA auf dem Agarosegel wurden nach weiteren 24 Stunden auf dem Nitrocellulosefilter mit Kugelschreiber leicht markiert. Der Filter wurde auf einem Blatt 3MM Papier 4-6 Stunden bei 80° C zur Fixierung der DNA gebacken.

DNA-Fragmente aus Phagen-DNA oder Plasmid-DNA wurden auf vereinfachte Art auf Nitrocellulosefilter übertragen, da in den Agarosegelen sehr viel mehr spezifische DNA pro Bande als bei genomischer DNA enthalten war. Ein weiterer Vorteil bestand darin, daß von einem Gel zwei Nitrocellulosefilterabzüge erhalten werden konnten. Dazu wurden auf einen 5 cm hohen Stapel Papierhandtücher zwei Blatt 3MM Papiers in der Größe des Agarosegels und darauf ein in 20xSSC äquilibrierter Nitrocellulosefilter gelegt. Das - wie oben beschrieben - vorbehandelte Gel wurde auf diesen Stapel gelegt. Der Reihe nach wurden nun ein weiterer äquilibrierter NC-

Filter, zwei in 20xSSC getränkte Blatt 3MM Papier und schließlich eine ebenfalls 5 cm hohe Schicht von Papierhandtüchern gelegt. Der Stapel wurde wie beschrieben beschwert, jedoch wurde der Transfer bereits nach 4-6 Stunden beendet und die Filter wie oben weiterbehandelt.

3.6.4. Hybridisierung mit *in-vitro*-markierten Proben

Prinzipiell wurden auf Nitrocellulosefilter fixierte DNA-Proben mit einer weiteren, radioaktiv markierten DNA-Probe inkubiert. Die Hybridisierungsbedingungen wurden gemäß der zu erwartenden Homologie der beiden Proben gewählt.

Zur Vorhybridisierung wurden bis zu 5 Nitrocellulosefilter in eine Polyethylen Klarsichtfolie eingeschweißt, die nach Zusatz von 5-25 ml Hybridisierungslösung (H-Mix) unter Vermeidung von Luftblasen vollständig zugeschweißt und mindestens 4 Stunden bei 42° C im Schüttelwasserbad inkubiert wurde. Mit diesem Verfahren wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosefilter abgesättigt. Der H-Mix der Vorhybridisierung wurde nach der Inkubation verworfen und je nach Zahl und Größe der Filter durch maximal 25 ml neuen H-Mix ersetzt.

Die nach 3.5.4. oder 3.5.5. markierte DNA-Probe wurde in 5 ml H-Mix in einem verschlossenen Röhrchen zum Denaturieren der DNA auf 100° C erhitzt, danach 10-15 Minuten im Eisbad abgeschreckt und zu den Filtern gegeben. Die dicht verschlossenen, luftblasenfreien Filter wurden in einem Schüttelwasserbad bei üblicherweise 42° C mindestens 16 Stunden, meistens 40 Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und bei 4° C aufbewahrt. Sie wurde bis zu viermal - nach erneutem Aufkochen und Abschrecken - zu Hybridisierungen verwendet, jedoch wurde dann nach der Vorhybridisierung kein frischer H-mix zu den Filtern gegeben.

Die Filter wurden nach der Hybridisierung zunächst bei Raumtemperatur zweimal je 10 Minuten mit 2xSSC/0,1% SDS - Lösung gewaschen, danach zweimal bei 52° C mit 0,1xSSC/0,1% SDS-Lösung, bevor sie auf 3MM Papier kurz getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR5) unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Du Pont Cronex, Lightning Plus, Quanta III) zwischen 4 Stunden und 6 Tagen bei -80° C exponiert wurden.

Bevor die Filter nochmals mit einer anderen markierten Probe hybridisiert wurden, wurde die vorher benutzte Probe 30-45 Minuten bei 90° C mit Waschpuffer unter gelegentlichem Schütteln von den Filtern abgewaschen. Die Filter wurden anschließend kurz an Luft getrocknet, 30 Minuten bei 80° C gebacken, erneut vorhybridisiert und mit einer anderen markierten Probe versetzt. Nitrocellulosefilter wurden bis zu dreimal mit verschiedenen Proben hybridisiert.

3.6.5. Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Gemäß 3.6.3. fixierte DNA wurde mindestens 4 Stunden in 6xNET, 10x Denhardts, 0,1% SDS bei 65° C vorhybridisiert. Die Temperatur der Hybridisierung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_d = 4xn(G^*C) + 2xn(A^*T) \text{ (}^{\circ}\text{C)}$$

wobei $n(G^*C)$ und $n(A^*T)$ die Zahl der ausgebildeten G^*C - bzw. A^*T -Paarungen bedeutet. Die Formel ist allerdings nur für Oligonukleotide mit einer Länge von 11-20 Nukleotiden gültig. Für die Hybridisierung wurde eine frische Lösung (wie oben) mit der nach 3.5.6. markierten DNA-Probe verwendet. Die Filter wurden zwei Stunden ohne Schütteln bei dieser Temperatur inkubiert, danach dreimal je 5 Minuten mit 6xSSC bei einer Temperatur gewaschen, die ca. 30-40° C unterhalb der Hybridisierungstemperatur lag. Anschließend wurden die Filter mit 6xSSC 1 Minute bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Wurden allelspezifische Punktmutationen untersucht, so wurde zunächst bei der Temperatur hybridisiert

und gewaschen, die sich nach Berechnung unter Berücksichtigung der geringeren Basenpaarung ergab. Nach Exposition (3.6.4.) wurde der Filter erneut mit 6xSSC gewaschen, dann jedoch bei der stringenteren Temperatur, bei der eine vollständig ausgebildete Basenpaarung vorlag.

3.7. Klonieren in Plasmide

3.7.1. Isolierung von Plasmiden

Alle Plasmide wurden präparativ nach der 'clear-lysate' - Methode isoliert. Plasmide für die transiente CAT-Expression wurden etwas abweichend von der normalerweise verwendeten Methode aufgearbeitet.

Die nach 3.3.1. vermehrten Bakterien wurden in einem Sorvall GSA-Rotor (10 min, 9000 rpm, 4° C) abzentrifugiert, nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes in 60 ml TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 6 ml Resuspensionspuffer (40 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl*pH 8,0; 25% Saccharose) aufgenommen, auf Eis gestellt und mit 1 ml Lysozymlösung (2 mg/ml) versetzt. Nach 5 Minuten wurden 1 ml EDTA (0,5 M) und nach weiteren 10 Minuten 10 ml autoklavierter Triton-Mix (50 mM Tris/HCl*pH 8,0; 60 mM EDTA; 0,1% Triton 100) zugegeben. Die Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln 20 Minuten auf Eis gestellt, anschließend wurde das Lysat in einem Sorvall SS34-Rotor (30 min, 20000 rpm, 0° C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und sein Volumen bestimmt. Beim Abnehmen wurde darauf geachtet, daß möglichst wenig der hochviskosen zellulären DNA mitgeschleppt wurde. Pro ml Überstand wurden 0,95 mg CsCl eingewogen und 40 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde nach Durchmischen und vollständigem Lösen des CsCl in einem Sorvall TV865-Rotor (20 h, 40000 rpm, 18° C) zentrifugiert. Unter langweiliger UV-Bestrahlung (366 nm) wurde aus dem Gradienten die fluoreszierende Plasmidbande durch seitliches Punktieren abgezogen.

Aufarbeitung I:

Das Ethidiumbromid wurde nach der Isolierung der Plasmidbanden durch viermaliges Ausschütteln mit einem fünffachen Volumen iso-Amylalkohol entfernt, die Phasen wurden jeweils durch Zentrifugieren getrennt. Das CsCl wurde nach nochmaligem Ausschütteln mit einem fünffachen Volumen CIA durch zweimalige Dialyse je 30 Minuten bei Raumtemperatur gegen jeweils 4 Liter TE-Puffer (pH 8,0) entfernt. Die Plasmidlösung wurde zweimal mit Phenol und einmal mit CIA ausgeschüttelt und die Phasen jeweils durch Zentrifugieren getrennt. Die DNA wurde nach Zugabe von 0,1 Vol Natriumacetat (3 M) und 2 Vol Ethanol (abs.) 40 Minuten bei -80°C gefällt und anschließend in einem Sorvall SS34-Rotor (20 min, 9000 rpm, 4°C) abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) kurz gewaschen, der sofort wieder vorsichtig abgegossen wurde. Die DNA wurde an Luft getrocknet, in 1 ml TE-Puffer (pH 8,0) gelöst und ihre Konzentration wie unten beschrieben bestimmt.

Aufarbeitung II:

Für CAT-Experimente verwendete Plasmide wurden erneut zentrifugiert (4 h, 56000 rpm, 18°C), nachdem die Plasmidbanden vereinigt, das Volumen mit CsCl-Lösung (1g/ml) auf 8,4 ml aufgefüllt und 320 μl der Ethidiumbromidlösung zugesetzt worden waren. Die Banden wurden wie oben beschrieben isoliert und vereinigt, das Ethidiumbromid wurde durch viermaliges Ausschütteln mit einem fünffachen Volumen iso-Amylalkohol entfernt. Die wäßrige Phase wurde viermal gegen je 4 Liter TE-Puffer (pH 8,0) dialysiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messen der OD_{260} bestimmt ($1 \text{ OD}_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml}$). Die DNA wurde als genügend rein angesehen, falls das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen 1,8 und 2,0 lag. Die DNA-Ausbeute lag in der Regel bei 500–1000 μg / Liter Bakterienkultur und variierte mit Art und Größe des Plasmids. Durch das zweimalige Zentrifugieren wurde eine Selektion auf die superhelikale Form der Plasmide erreicht; diese war für eine Expression mit großer Reproduzierbarkeit in eukaryotischen Zellen notwendig.

3.7.2. Vorbehandlung des Vektors

10 µg eines gereinigten Plasmids wurden je nach Bedarf mit einem oder zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten (zwei verschiedene Schnittstellen wurden beim 'directional cloning' benötigt). Um eine Religierung des Vektors zu vermeiden, wurde das gesplattene Plasmid mit alkalischer Phosphatase behandelt (3.5.3). Die DNA wurde in 400 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei -20° C aufbewahrt. Als Vektorkontrolle wurden jeweils 50 µg ohne Fragmente ligiert (3.5.7.) und transformiert (3.7.4.). Der Vektor wurde verwendet, wenn bei dieser Kontrollreaktion weniger als 20 Klone/ 50 µg Vektor erhalten wurden, üblicherweise lag die Zahl bei 0-10 Klonen. Für jeden Klonierungsvorgang wurden 50-200 ng des Vektors eingesetzt, als Vektoren wurden die E.coli Plasmide pUC 8, pUC 12 und pUC 18 verwendet.

3.7.3. Vorbereiten der DNA-Fragmente

Nach der Spaltung wurden die Restriktionsenzyme durch Hitzeinkubation inaktiviert (15 min, 68° C). Waren alle Enzyme auf diese Weise inaktivierbar, so wurde die DNA direkt in die Ligasereaktion eingesetzt (3.5.7.). Andernfalls wurde die DNA-Lösung zweimal mit Phenol und einmal mit CIA extrahiert, und nach einer Ethanol-fällung (3.5.1.) in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Nach 3.6.2. isolierte DNA-Fragmente wurden ohne weitere Behandlung für die Ligasereaktion verwendet.

3.7.4. Transformationskompetente Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage exogene DNA mit einer bestimmten Frequenz aufzunehmen und wurden nach einer Methode von D.A. Morrison, 1979 dargestellt. Ein für das aufzunehmende Plasmid geeigneter E.coli Stamm (HB 101 oder JM83) wurde in 200 ml LB-Medium durch Zugabe von 2 ml einer Übernachtskultur und Schütteln bei 37° C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezüchtet. Nach Erreichen dieser Konzentration wurde die Kultur in einem Salz-Eisbad (-15° C) schnell auf 0-5° C abgekühlt und in einem Sorvall GSA-Rotor (10 min, 8000 rpm, 4° C)

abzentrifugiert. Das Sediment wurde in insgesamt 50 ml eiskalter $MgCl_2$ -Lösung (0,1 M) vorsichtig aufgenommen, in einer Tischzentrifuge (10 min, 1500 rpm, 4° C) erneut abzentrifugiert, in 50 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen, 20 Minuten bei 0° C gehalten und wie zuvor abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml Lösung (0,1 M $CaCl_2$, 80% Glycerin) resuspendiert, portionsweise in vorgekühlte Eppendorfgläser abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei -80° C im Tiefkühlschrank aufbewahrt wurden.

3.7.5. Transformation der Bakterien

Der Ligaseansatz wurde zu 100 µl auf Eis aufgetaut, kompetenter Bakterien gegeben, damit vermischt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden danach einem Hitzeschock (2 min, 42° C) ausgesetzt, mit 900 µl LB-Medium versetzt und 30-90 Minuten bei 37° C in einer Schüttelapparatur inkubiert. Jeweils 200 µl wurden auf einem Selektivnährboden ausgespatelt und bei 37° C über Nacht inkubiert.

3.7.6. Selektion und Identifizierung rekombinanter Plasmide

Die Verwendung von pUC-Plasmiden als Vektoren erlaubte eine Selektion auf zwei Arten. Transformation der Ligaseansätze in einem E.coli Stamm, der in seinem eigenen Genom kein Gen für eine Resistenz gegen Ampicillin (Amp) enthält, ermöglichte eine Selektion auf Amp-haltigen Nährböden, da ein Ampicillingen auf den pUC-Plasmiden enthalten ist. Da die Effizienz der Vektoren getestet worden war (3.7.2.), enthielten >95% aller ampicillinresistenten Kolonien den Vektor mit eingebautem DNA-Fragment.

Eine zweite Art der Selektion beruht auf der Funktion der β -Galaktosidase, deren *lacZ'*-Gen auf den pUC-Vektoren durch erfolgreiche Klonierungen unterbrochen und in der Regel inaktiviert wird. In diesem Fall wurden vor dem Ausspateln 10 µl

IPTG (100 mM) und 50 μ l X-Gal (2% in DMFA) zu den transformierten Bakterien gegeben. Bei einem Einbau von DNA-Fragmenten, und damit der Inaktivierung der β -Galaktosidase wurden weiße Kolonien erhalten. Der Einbau der Fragmente wurde zusätzlich noch durch Gelelektrophorese der Plasmid-DNA überprüft, die aus Schnellaufschlüssen isoliert wurde.

3.7.7. Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA

Um mehrere der nach 3.7.5. erhaltenen Klone schnell auf Art und Gehalt von Plasmiden zu überprüfen, wurden sie im wesentlichen nach einer - von D.Ish-Horowitz modifizierten - Methode von Birnboim und Doly (1979) durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Dazu wurden 5 ml LB-Medium, das ein geeignetes Antibiotikum enthielt, mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht in einer Schüttelapparatur bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation mit einem Sorvall SS34-Rotor (5 min, 6000 rpm, 4° C) geerntet. Das Sediment wurde nach möglichst vollständigem Abgießen des Überstandes in 100 μ l Lysozym/Glucosepuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl* μ H 8,0; 10 mM EDTA; 4 mg/ml Lysozym) aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μ l einer NaOH-Lösung (0,2 M; 1% SDS) zugegeben und die Suspension 5 Minuten auf Eis gestellt. Zu der inzwischen klaren Lösung wurden 150 μ l Kaliumacetatlösung (60 ml 5 M KAc; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml H₂O) zugegeben; die gefällten Proteine wurden nach weiteren 5 Minuten im Eisbad in einer Tischkühlzentrifuge sedimentiert (5 min, 15000 rpm, 4° C). Der Überstand wurde zweimal mit Phenol und zweimal mit CIA extrahiert, die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt, wobei die wäßrige Phase jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach einer Ethanolfällung (3.5.1.) wurde die DNA in 100 μ l TE-Puffer aufgenommen, mit 5 μ l RNase A (10 mg/ml) versetzt und bei -20° C aufbewahrt.

3.8. Klonieren in M13-Phagen

Die doppelsträngige, zirkuläre RF-DNA des Phagen M13 in den Formen: mp9, mp10 und mp11 wurden freundlicherweise von P. Heinrich und H. Kühnel zur Verfügung gestellt. Die Behandlung des Vektors, der DNA-Fragmente und die Ligasereaktion wurden analog zu den Klonierungen mit Plasmiden ausgeführt (3.5.2. ; 3.5.3. ; 3.5.7. ; 3.7.2. und 3.7.3).

3.8.1. Transformationskompetente Bakterien und Transformation

Transformationskompetente Bakterien des Stammes JM 103 wurden jeweils frisch hergestellt, da sie bei einer Aufbewahrung bei -80°C ihre Kompetenz verlieren. Mit einer einzelnen Kolonie, die auf einer Minimalmedium enthaltenden Agarplatte vermehrt worden war, wurde eine Übernachtskultur in 5 ml autoklaviertem TY-Medium angesetzt. Mit 2 ml dieser Kultur wurden 100 ml TY-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden vermehrt, bis eine $\text{OD}_{600} \approx 0,4\text{--}0,6$ erreicht war, mit 2 ml dieser exponentiell wachsenden Kultur wurden zu diesem Zeitpunkt erneut 100 ml TY-Medium angeimpft.

Die Bakterien der gewachsenen Kultur wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall SS34-Rotor (5 min, 6000 rpm, 4°C) geerntet, in 50 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (50 mM) aufgenommen und 40 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden danach unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert und in 10 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (50 mM) vorsichtig resuspendiert. Zu 300 μl dieser kompetenten Bakterien wurde ein bestimmter Teil dieses Ligaseansatzes pipettiert, dessen Verdünnung nach der zu erwartenden Phagenzahl berechnet wurde. Die Suspension wurde vorsichtig durchmischt und 40 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock (2 min, 42°C) wurden zusammen mit den Bakterien pro Ansatz ausplattiert:

- 10 μl IPTG (0,1 M)
- 50 μl X-Gal (2% in DMFA)
- 0,2 ml exponentiell wachsender JM 103
- 3 ml M13 Top-Agarose (TY-Medium; 0,5% Agarose)

Nach Erstarren der Top-Agarose bei Zimmertemperatur (ca. 20 min) wurden die Platten über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

3.8.2 Schnellaufschlußmethode zur Identifizierung rekombinanter Klone

Die Selektion der Phagen, die fremde DNA in ihrem Genom inseriert hatten, beruhte auf Inaktivierung der β -Galaktosidase (s. 3.7.6.). Zur Kontrolle wurde die RF-Form der DNA weißer Klone isoliert und durch Restriktionsenzymenspaltung charakterisiert. 100 ml TY-Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur (3.8.1.) angeimpft und die Bakterien bis zum Erreichen einer $OD_{600} \approx 0,4-0,6$ vermehrt. Je ein weißer Phage wurde gepickt, mit 2 ml dieser exponentiell wachsenden Bakterien versetzt und über Nacht in einer Schüttelapparatur bei 37° C vermehrt.

1,5 ml Bakterienkultur wurden am nächsten Tag zentrifugiert und der M13-Phagen enthaltende Überstand zur Isolierung der ss-Form der M13-DNA bei 4° C aufbewahrt, nachdem er 5 Minuten bei 68° C inkubiert worden war. Die doppelsträngige DNA wurde nach 3.7.7. isoliert, in 20 μ l TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und mit 2 μ l RNase A versetzt. Durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen und nachfolgender Gelelektrophorese wurde die DNA auf den Gehalt inserierter DNA hin überprüft.

3.8.3. Isolierung von M13 ss(+)-DNA

Die M13 ss(+)-DNA wurde nach der Vorschrift des BRL-Sequenzierungs-Handbuchs isoliert. 100 ml TY-Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur des E.coli Stammes JM 103 (s.3.8.1.) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,4-0,6$ gezüchtet. 10 μ l dieser exponentiell wachsenden JM 103 wurden zusammen mit einem gepickten Plaque in 1 ml TY-Medium gegeben und bei 37° C über Nacht inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag 10 Minuten in einer Eppendorf-zentrifuge sedimentiert, und als Stock für die entsprechenden M13-Klone bei 4° C aufbewahrt. Der Überstand wurde mit 200 μ l PEG-Lösung (20% PEG 6000;

2,5 M NaCl) versetzt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Wände des Reaktionsgefäßes mit einem Küchenpapier trocken gewischt, das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung mit 50 µl Phenol durchmischt, bei Raumtemperatur inkubiert, erneut stark mit dem Phenol vermischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. 80 µl der wäßrigen Phase wurden vorsichtig abgenommen – ohne daß Phenol oder Proteinreste mitgeschleppt wurden – und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei -20° C aufbewahrt; ihre Konzentration wurde bestimmt, indem 10 µl der DNA-Lösung mit 190 µl TE-Puffer verdünnt und die OD₂₆₀ gemessen wurde. Für einzelsträngige DNA gilt: 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml.

3.9. Sequenzierung von DNA nach dem Dideoxyverfahren

3.9.1. Sequenzierung von M13 ss(+)-DNA

M13 (+)-Einzelstrang-DNA wurde nach dem von Sanger et al., 1977 entwickelten Verfahren durch enzymatische Synthese des Gegenstranges unter Zugabe kettenabbruchender Inhibitoren sequenziert. Dabei wurde gemäß dem BRL-Sequenzierungshandbuch vorgegangen. In einem 500 µl Eppendorfgefäß wurden

0,5 µg DNA (3.8.3.)

2 ng Universalprimer (s.u.)

1 µl Polymerasepuffer

pipettiert und das Volumen mit bidestilliertem, sterilem Wasser auf 12,5 µl eingestellt. Das gut verschlossene Reaktionsgefäß wurde in ein mit 8 ml Wasser gefülltes Röhrchen (Greiner) gestellt, das sich in einem 90° C warmen Wasserbad befand. Nach 5 Minuten wurde das Röhrchen mit dem Reaktionsgefäß für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das langsame Abkühlen war eine exakte Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige DNA gewährleistet. Zu der Primer-Template-Lösung wurden

10 µCi α-³²P-dCTP (bzw. 15-20 µCi α-³⁵S-dATP)

1 µl DTT (0,1 M)

1 µl Klenow-Polymerase (5 U)

pipettiert und sorgfältig damit vermischt. Je 3,5 μl des Reaktionsgemisches wurden zu jeweils 2 μl 'A-, C-, G- bzw. T-Mix' (s.u.) gegeben und damit sorgfältig vermischt. Die Reaktion mit $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ fand bei Raumtemperatur statt, bei Verwendung von $\alpha\text{-}^{35}\text{S}\text{-dATP}$ wurde die Reaktion bei 30° C durchgeführt. Nach 15 Minuten wurde zu jedem Ansatz 1 μl 'chase'-Lösung gegeben und die Reaktion weitere 15 Minuten bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt. Nach Zugabe von 9 μl Auftragspuffer, der die Reaktion beendete, wurden die Ansätze sofort für die Gelelektrophorese verwendet, oder anderenfalls bei -80° C eingefroren. Ursprünglich wurden ^{32}P -markierte Nukleotide verwendet, mit ^{35}S -markierten Proben wurde jedoch eine bessere Bandenschärfe erreicht. Außerdem waren die ^{35}S -markierten Proben länger verwendbar, da kaum eine Autoradiolyse stattfand.

Konzentration der Nukleotide				
Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
d ATP	4 μM	83 μM	83 μM	83 μM
d GTP	83 μM	83 μM	4 μM	83 μM
d TTP	83 μM	83 μM	83 μM	4 μM
dd NTP	500 μM	175 μM	350 μM	1 mM
jeweils in 1xPolymerasepuffer				

Tab. 3.9-1: Mixe zur M13-DNA-Sequenzierung mit ^{32}P

Konzentration der Nukleotide				
Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
d CTP	100 μM	10 μM	100 μM	100 μM
d GTP	100 μM	100 μM	5 μM	100 μM
d TTP	100 μM	100 μM	100 μM	5 μM
dd NTP	250 μM	250 μM	250 μM	1 mM
jeweils in 1xPolymerasepuffer				

Tab. 3.9-2: Mixe zur M13-DNA Sequenzierung mit ^{35}S

3.9.2. Sequenzieren doppelsträngiger DNA

Wallace et al., 1981 konnten zeigen, daß sich das von Sanger entwickelte Verfahren auch zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA bei Verwendung geeigneter Primer eignet. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß aufwendige Reinigungs- und Klonierungsschritte sowie Probleme mit der Stabilität der insertierten DNA (wie bei M13) entfallen. Im einzelnen wurde dabei gemäß dem von Chen und Seeburg, 1985 beschriebenen Verfahren vorgegangen. Plasmid-DNA, die aus Schnellaufschlüssen gewonnen wurde (3.7.7.), wurde mit RNase A 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die RNase durch Extrahieren mit Phenol (2x) und CIA (1x) inaktiviert. Nach einer Ethanolfällung (3.5.1.) wurde die DNA in H₂O aufgenommen. Für jeden Reaktionsansatz wurden 0,5 µg lyophilisiert, die restliche DNA wurde bei -20° aufbewahrt.

Die lyophilisierte DNA wurde in 20 µl Denaturierungslösung (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) aufgenommen, gut vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Neutralisierungslösung (2 M NH₄Ac* pH 4,5) wurde die DNA mit 55 µl Ethanol (abs.) 20 Minuten bei -80° C gefällt (3.5.1.). Die DNA wurde in einer Tischkühlzentrifuge sedimentiert, mit 100 µl Ethanol (70%) gewaschen, und lyophilisiert. Die getrocknete, denaturierte DNA wurde in:

9,5 µl H₂O,

1,5 µl Polymerasepuffer

1 µl Primer (≈5 pMol)

aufgenommen und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Zu dem Primer-Nukleotidgemisch wurden anschließend:

1 µl DTT (0,1M)

1 µl Klenow-Polymerase (5 U)

20 µCi α-³⁵S-dATP

gegeben.

Nach gutem Durchmischen wurden je 3,3 μ l des Reaktionsgemisches zu jeweils 2 μ l 'A-, C-, G- bzw T-Mix' pipettiert, damit gut vermischt und 30 Minuten bei 30° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 μ l Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet oder bei - 80°C aufbewahrt.

Sequenz des Universalprimers:

5'-TCCCAGTCACGACGT-3'

Sequenz des reversen Primers:

5'-AACAGCTATGACCATG-3'

Konzentration der Nukleotide				
Nukleotide	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
d CTP	100 μ M	10 μ M	100 μ M	100 μ M
d GTP	100 μ M	100 μ M	5 μ M	100 μ M
d TTP	100 μ M	100 μ M	100 μ M	5 μ M
dd NTP	125 μ M	300 μ M	200 μ M	2 mM
jeweils in 1xPolymerasepuffer				

Tab 3.9-3 Mixe zur Sequenzierung
doppelsträngiger DNA

3.9.3. Elektrophorese von Sequenzgelen

Die Produkte, die bei der Sequenzreaktion entstanden, wurden über Polyacrylamidgele (5-8%) aufgetrennt, die entweder keilförmig (0,1-0,4 mm) oder gleichmäßig stark (0,1-0,4 mm) beschaffen waren. Eine Verwendung von 0,1 mm starken Gelen hatte den Vorteil, daß die Auftrennung schnell erfolgte und eine Absorption der Strahlung durch das dünne, getrocknete Gel gering gehalten wurde.

Keilgele, die in Laufrichtung von oben (0,1 mm) nach unten (0,4 mm) an Dicke zunahmen, ließen durch nach unten abnehmende Stromdichte die Banden enger zusammenrücken, sodaß pro Spur mehr Banden gelesen werden konnten. Die Gele wurden mittels einer 'Makrophor'-Apparatur (LKB) hergestellt, von der gleichen Firma wurden auch Spannungsgerät und Gelapparatur verwendet. Die Glasplatten wurden mit SDS-Lösung (5%), NaOH (0,5 M) und H₂O gesäubert. Die Haftplatte wurde mit Bindsilan (18,7 µl γ-Methoxyloxypropyl-trimethoxysilan; 187,5 µl Essigsäure (10%); 6 ml Ethanol (abs.)), die Thermostatplatte zweimal mit Sillikonlösung (Serva) vorbehandelt. Beide Platten wurden abschließend mit Ethanol (abs.) poliert. Durch diese Behandlung wurde erreicht, daß das Gel nach der Elektrophorese beim Trennen der beiden Platten an der Haftplatte verblieb.

Die Gellänge betrug 60 cm, die Elektrophorese wurde bei 30 mA pro Platte (Keilgele) bzw. 45 mA (0,1 mm Dicke) durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der Harnstoff 15 Minuten bei Raumtemperatur mit

10% Essigsäure aus dem Gel herausgewaschen. Das Gel wurde bei 80° C vollständig auf der Haftplatte getrocknet. Für die Autoradiographie, die bei Raumtemperatur erfolgte, wurde ein Kodak XOMAT AR5 - Röntgenfilm verwendet.

Laufpuffer (10x TBE):

1 M Tris
830 mM Borsäure
10 mM EDTA

Acrylamidlösung (5%):

42 g Harnstoff
4,75 g Acrylamid
0,25 g Bisacrylamid
10 ml 10x TBE-Puffer
ad 100 ml H₂O

Zur steril filtrierten Acrylamidlösung wurden kurz vor Gießen des Geles 800 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (10%) und 40 µl TEMED gegeben und gut damit vermischt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Partielle Duplikation des c-myc Gens

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnten mit einer 3'-c-myc Probe, die das dritte Exon enthielt, aus einer Genbank der Burkitt-Lymphom-Linie BL 64 rekombinante Phagen isoliert werden, die zum Teil ihrer Struktur nach nicht mit veröffentlichten Daten übereinstimmten (Hartl, 1984). Zunächst mußte daher geklärt werden, ob sich diese abweichenden Strukturen der Phagen 64/07 und 64/08 auf genomischer Ebene verifizieren ließen. Es wäre möglich gewesen, daß diese Phagen Mitglieder einer Genfamilie oder Pseudogene repräsentierten. Ebenso konnten Klonierungsartefakte oder Rekombinationsereignisse während der Vermehrung der Phagen nicht ausgeschlossen werden.

4.1.1. Identifizierung einer Amplifikation des c-myc Gens

Um die Struktur und das Ausmaß einer etwaigen Amplifikation des c-myc Gens auf genomischer Ebene zu überprüfen, wurden je 15 µg DNA aus BL64 - und IARC 184-Zellen mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III sowie Xba I gespalten. Die gesplattene DNA wurde nach der Auftrennung durch Elektrophorese auf Nitrocellulosefilter transferiert und gegen eine radioaktiv markierte c-myc Probe hybridisiert, die das dritte Exon enthielt (3'-c-myc Probe). Nach Autoradiographie des Filters (Abb. 4.1.-1a) konnte bei jedem der Spaltansätze der IARC 184 DNA nur eine Bande beobachtet werden, die jeweils der erwarteten Größe entsprach (Bam HI: >26 kb; Bgl II: 6 kb; Eco RI: 12,5 kb; Hind III: 11 kb; Xba I: 7 kb). Dagegen traten bei einigen Spaltungen der BL 64 DNA weitere Banden auf, deren Intensität um die Hälfte geringer war als die der erwarteten Banden (Eco RI: 9 kb; Hind III: 7,8 kb; Xba I: 7 kb). Die Banden der Bam HI - und Bgl II - Spaltungen wiesen die dreifache Intensität der submolaren Banden auf. Das Auftreten zusätzlicher Banden nur bei BL64, nicht aber bei IARC 184 bedeutete, daß mit der verwendeten Hybridisierungsprobe keine Mitglieder einer Genfamilie oder

Pseudogene erfaßt wurden, denn diese wären bei beiden Zelllinien zu beobachten gewesen. Die Intensitätsverteilung der Banden bei BL 64 deutete an, daß drei Kopien des dritten Exons im Genom enthalten sind.

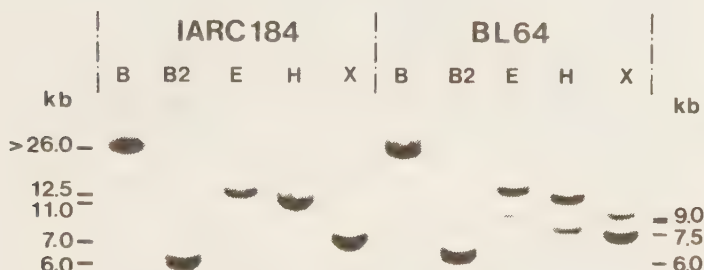


Abb. 4.1.-1a: Southern- Blot Analyse von 184- und BL 64 - DNA mit einer 3'-c-myc-Probe
(B: Bam HI; B2: Bgl II; E: Eco RI; H: Hind III; X: Xba I)

Aus der Struktur der Phagen 64/07 und 64/08 (Abb. 4.1.-1b) wären neben der normalen Bande der Hind III - Spaltung weitere Banden der Größen 9 kb (64/07) und 7,5 kb (64/08) zu erwarten gewesen, falls beide Phagen den Zustand des Genoms repräsentierten. Jedoch war nur die zusätzliche Bande bei 7,5 kb zu erkennen. Damit konnte gezeigt werden, daß die Struktur des Phagen 64/07 nicht der genomischen DNA-Struktur entsprach, sie mußte auf ein Klonierungsartefakt zurückgeführt werden. Zusätzlich deutete die Intensitätsverteilung der Banden nur eine zusätzliche Kopie des dritten Exons an, so wie sie aus der Struktur des Phagen 64/08 zu erklären war.



Abb. 4.1.-1b: Strukturen der Phagen 64/07 und 64/08, die mit der 3'-c-myc-Probe hybridisierenden Fragmente sind durch Balken hervorgehoben

4.1.2. Charakterisierung duplikationsspezifischer Phagen

Anhand eines Strukturvergleichs des Phagen 64/08 mit den Phagen 64/04 und 64/05 (Abb. 4.1.-2) bezüglich den Restriktionsenzym-Schnittstellen war zu erkennen, daß die Amplifikation des *c-myc* Gens innerhalb eines 4,5 kb großen Eco RI / Hind III - Fragments liegen mußte. Da die Eco RI - Schnittstellen (E^1 und E^2 ; Abb. 4.1.-2) des Phagen 64/08 einander entsprachen, war die Länge der Duplikation durch den Abstand dieser beiden Schnittstellen von 9 kb gegeben.

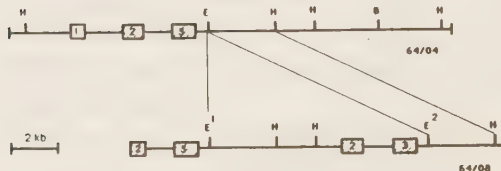


Abb. 4.1.-2: Strukturvergleich der Phagen 64/04 und 64/08

Um den genauen Umfang der Duplikation bezüglich des *c-myc* Gens zu bestimmen wurden verschiedene Bereiche des Phagen 64/08 nach Spaltung mit den Enzymen Eco RI und Hind III unter Verwendung des Vektors pUC 12 im 'shot-gun'-Verfahren subkloniert und mit Restriktionsenzymen kartiert. Aus dem subklonierten Plasmid pH 202/4 wurde nach Spaltung ein weiterer Subklon erhalten, das Klonierungsschema ist in Abb. 4.1.-3 dargestellt.

Ein Vergleich (Abb. 4.1.-4) der Schnittstellen - nach Kartierung der Subklone - innerhalb des 4,5 kb großen Eco RI / Hind III -Fragments (B) mit der normalen Struktur des *c-myc*-Gens (A) führte zu der Vermutung, daß der Übergang zur Duplikation in dem 0,6 kb großen Hind III / Sma I Fragment lag (Pfeil in Abb.4.1.-4). Alle anderen Schnittstellen stimmten mit der Konfiguration des normalen 3'-*c-myc* Bereichs überein. Dies bedeutete, daß nicht das vollständige Gen, sondern nur das zweite und dritte Exon mit einem nachfolgenden 3'-Anteil dupliziert vorlag.

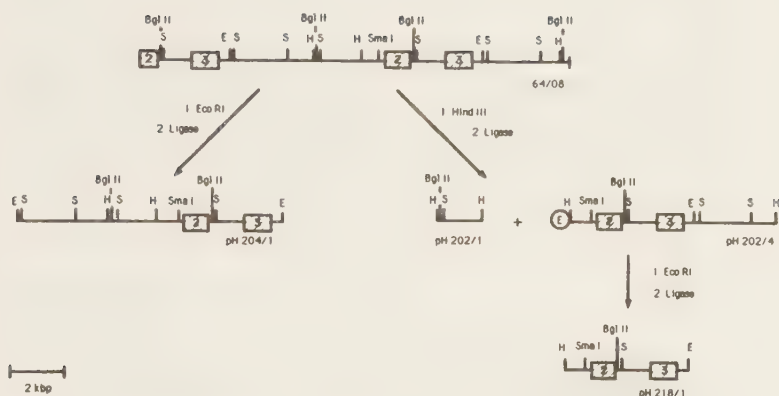


Abb. 4.1.-3: Subklonierungen aus 64/08

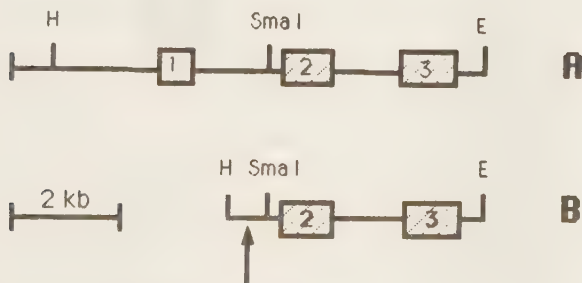


Abb. 4.1.-4: Lage des Duplikationsübergangs

Aufgrund dieser Ergebnisse, die zeigten, daß eine teilweise lineare Duplikation des c-myc Gens vorliegen mußte, wurde die Struktur des Phagen 64/06 mit einer Probe, die das zweite Exon enthielt, überprüft. Die Isolierung und Charakterisierung dieses rekombinanten Phagen mit der 3'-c-myc Probe wurde bereits beschrieben (Hartl, 1984). Die ursprüngliche Analyse erlaubte keine Zuordnung des Phagen zu einem der beiden Allele, da aufgrund der Länge der insertierten DNA maximal ein kleiner Bereich des duplizierten zweiten Exons, nicht

jedoch des dritten Exons enthalten sein konnte. Um die Zugehörigkeit zu klären, wurde die Phagen - DNA mit den Enzymkombinationen Eco RI / Sal I (E/S) und Hind III / Sal I (H/S) gespalten (Abb. 4.1.-5a). Nach dem Transfer der DNA auf Nitrocellulosefilter wurde die DNA gegen eine Probe hybridisiert, die spezifisch für das zweite Exon war. Die Autoradiographie (Abb. 4.1.-5b) zeigte, daß jeweils zwei Fragmente hybridisierten: bei der E/S - Spaltung die beiden Fragmente, die dem gesamten Insert entsprachen (10,5 kb und 5,8 kb), bei der H/S - Spaltung jedoch nur das 10,5 kb H/H - und das 1,3 kb H/S - Fragment, welches am 3'-Ende des Phagen liegt (Abb. 4.1.-5c) und dem erwarteten duplizierten Teil entsprach.

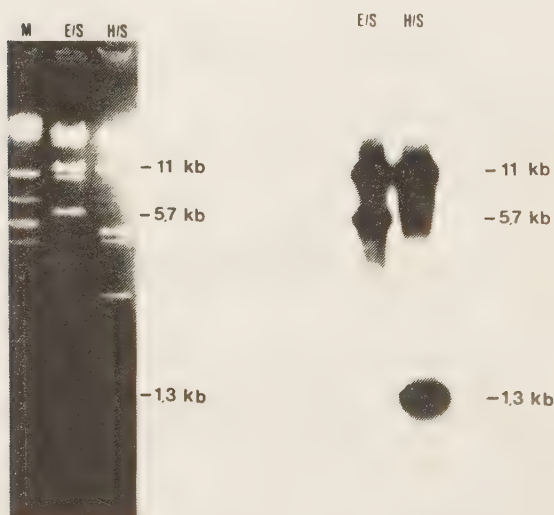


Abb. 4.1.-5a: Spaltmuster und Abb. 4.1.-5b: Autoradiographie von 64/06
(M: Marker-DNA; E: Eco RI; S: Sal I)

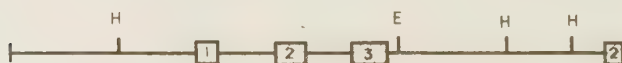


Abb. 4.1.-5c: Struktur des Phagen 64/06

Diese Ergebnisse erlaubten nun eine Zuordnung der Phagen 64/04 und 64/05 zum normalen Allel, und der Phagen 64/06 und 64/08 zum Allel mit der Duplikation. Durch die eindeutige Zuordnung der Phagen 64/06 und 64/04 war nun eine Unterscheidung der vollständigen *c-myc* Gene möglich geworden, von denen eines dem translozierten Chromosom 8q⁺, das andere dem Chromosom 8 entsprechen mußte. Eine Zuordnung der Allele zu den Chromosomen war aus diesen Resultaten nicht möglich, da keiner von ihnen den Bruchpunkt der Translokation enthielt.

4.1.3. Sequenzierung des Übergangs zur Duplikation

Aus der kartierten Struktur des Plasmids pH 202/4, die mit veröffentlichten Daten verglichen wurde, ging hervor, daß der Übergang zur Duplikation in dem 0,6 kb Hind III / Sma I - Fragment liegen mußte (Abb. 4.1.-3). Daher wurde dieses Fragment in den Vektor M13 mp11 kloniert, der mit diesen Enzymen vorbehandelt worden war. Die Verwendung dieses Vektors ermöglichte eine Sequenzierung ausgehend von der Sma I - Schnittstelle, die noch im *c-myc* Gen lag. Ein Vergleich der in Abb. 4.1.-6 dargestellten Sequenz (A) mit der publizierten Sequenz (B: Gazin et al., 1984) zeigte, daß der Übergang zwischen den Positionen 4183 und 4184 und damit genau 386 bp vor dem Startcodon ATG lag. Die konservierten, kryptischen Promotoren, die im ersten Intron liegen und deren Benutzung bei t(8;14) Translokationen beschrieben wurde (Bernard et al., 1983), lagen außerhalb des duplizierten Bereichs. Eine Hybridisierung von RNA gegen die 3'-*c-myc* Probe zeigte keine zusätzlichen, BL 64 spezifischen RNA-Spezies, sodaß die Duplikation vermutlich nicht zur Bildung weiterer *c-myc* spezifischer RNA führt. Das Auftreten von seltenen Transkripten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

	TCTTCCACAA ATC-----	4190	A
4171	GCGGCTTCTT AAGGGCGCCA	4190	B

Abb. 4.1.-6: Sequenzvergleich des Übergangs zur Duplikation mit der Keimbahnsequenz des *c-myc*-Gens

4.1.4. Identifizierung der c-myc Duplikation als Polymorphismus

Eine andere, das c-myc Gen betreffende strukturelle Änderung wurde bereits beschrieben (Taub et al., 1984). In diesem Fall führte eine Duplikation der Promotorregion in der Linie JBL 2 zu einem zusätzlichen Transkript in erhöhter Menge. Um der Frage nachzugehen, ob die partielle Duplikation in der Linie BL 64 mit dem Translokationsereignis zusammenhing, wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Verwendet wurde neben BL 64 - DNA auch DNA aus IARC 549 - Zellen, einer lymphoblastoide Zelllinie aus peripheren Leukozyten des selben Patienten. Daneben wurde DNA aus den Zellen EW 12 und IARC 316, einer lymphoblastoiden Vergleichslinie des EW 12 Patienten, verwendet. Eine Hybridisierung von DNA aus diesen Zelllinien gegen die 3'-c-myc Probe hatte ein ähnliches Hybridisierungsmuster ergeben (J.-M. Bechet, pers. Mitteilung), ohne daß die Struktur des c-myc Gens aufgeklärt werden konnte.

Je 15 µg DNA dieser Zellen (IARC 316: 25 µg) wurden mit Hind III gespalten und nach Auftrennung der DNA über ein Agarosegel (0,8%) auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die Autoradiographie des gegen die 3'-c-myc Probe hybridisierten Filters zeigte bei allen Zelllinien das gleiche Hybridisierungsmuster (Abb 4.1.-7).



Abb. 4.1.-7: Southern-Blot Analyse von DNA verschiedener Zelllinien mit einer 3'-c-myc Probe (H: Hind III; Erläuterung im Text)

Die Duplikation war daher als konstitutionell anzusehen und nicht mit dem Translokationsereignis der BL 64 Zellen in Verbindung zu bringen. Interessanterweise zeigt eine von G. Lenoir aufgrund dieser Ergebnisse durchgeführte Studie, daß beide Patienten und ihre Familien - soweit dies zurückzuverfolgen möglich war - nicht verwandt sind (G. Lenoir et al., 1986). Dies bedeutet, daß die Duplikation einen neuartigen Polymorphismus des c-myc Gens zweier nicht in Zusammenhang stehender Familien darstellte, ohne daß jedoch ein Zusammenhang mit der Tumorgenese der Patienten herzustellen war, wie die oben angeführte Studie ergab.

4.2. Vergleich der beiden c-myc Allele aus BL 64

Normalerweise sind bei varianten Translokationen die beiden c-myc Allele nicht auf einfache Weise voneinander unterscheidbar, da der Bruchpunkt meistens weit vom c-myc Genort entfernt ist, d.h. die beiden Allele können nicht durch eine Änderung des Schnittmusters der Restriktionsenzyme voneinander unterschieden werden. Eine Möglichkeit, diese Allele getrennt zu analysieren, besteht daher im allgemeinen nur in der Isolierung von Hybriden der Burkitt-Lymphom -Zellen mit Maus-Myelom-Zellen, welche auf die entsprechenden menschlichen Chromosomen hin selektioniert werden müssen. Die unter 4.1. beschriebenen Ergebnisse ermöglichten eine einfache Unterscheidung beider c-myc Allele und damit die Möglichkeit, sie getrennt zu untersuchen, ohne jedoch Aufschluß darüber zu geben, welches der Allele von der Translokation betroffen war.

4.2.1. Sequenzanalyse des ersten Exons beider Allele

In einigen Burkitt-Lymphom-Linien sind Mutationen im Bereich des ersten und zweiten Exons beschrieben worden (Rabbitts et al., 1984). Bisher wurde jedoch ein Einfluß dieser Mutationen auf Transkription oder Translation nicht untersucht. Die unterschiedliche Struktur der beiden c-myc Allele gestattete es nun zunächst von beiden Allelen definierte DNA-Bereiche zu sequenzieren. Ausgewählt wurde jeweils ein 1041 bp großes Sma I / Sac I - Fragment, das - neben der Promotorregion und

einem Teil des ersten Introns - das erste Exon vollständig enthielt. Wie die Translokationen zeigen, die bei Burkitt-Lymphomen häufig in diesem Bereich liegen, wird seine strukturelle Veränderung von den Zellen toleriert und ist vielleicht in einigen Fällen sogar die Ursache, die zur Veränderung der *c-myc* Regulation führt. Andererseits wurden starke strukturelle Änderungen des zweiten oder des dritten Exons in Burkitt-Lymphomen nicht gefunden. Aus dieser Überlegung heraus war am ehesten eine Veränderung in dem zur Sequenzierung verwendeten Bereich zu erwarten.

Zunächst wurde aus den Phagen 64/04 und 64/06 (D) jeweils ein 3,4 kb großes Hind III / Sac I - Fragment unter Verwendung des Vektors pUC 12 subkloniert. Aus den subklonierten Plasmiden pH 243/1 und pH 234/1 (D) wurde dieses Fragment isoliert und mit dem Enzym Xho I gespalten. Da Xho I DNA-Enden erzeugt, die mit Sal I - Schnittstellen kompatibel sind, wurden - nach Hitzeinaktivierung der Enzyme - die Spaltprodukte direkt aus dem Spaltansatz in mit Hind III / Sal I - bzw. Sac I / Sal I - gesplattene pUC 12 - Vektoren kloniert. Die Klone wurden durch Schnellaufschlüsse überprüft, es wurden die Klone pH 239 bzw. 240 (D) (Hind III / Sal I) und pH 241 bzw. 242 (D) (Sac I / Sal I) erhalten.

Aus den Plasmiden pH 239 und 240 (D) wurden die insertierten Fragmente mit den Enzymen Hind III und , da die Sal I - Stelle bei der Klonierung nicht erhalten blieb, Sac I herausgespalten, über ein Agarosegel (1%) gereinigt und mit dem Enzym Pvu II gespalten, das glatte, mit Sma I - Schnittstellen kompatible Enden erzeugt. Nach Inaktivierung des Enzyms wurden die Subfragmente in mit Hind III / Sma I und Sac I / Sma I gesplattene Vektoren M13 mp10, M13 mp11 sowie pUC 12 kloniert.

Aus dem Polylinker der Plasmide pH 241 und 242 (D) (s.o.) wurden die klonierten Fragmente mit den Enzymen Sac I und Hind III (die Sma I - Stelle ging verloren) herausgespalten, über ein Agarosegel (1%) isoliert und mit Pvu II gespalten. Die beiden neuen Subfragmente wurden wie oben in die Vektoren M13 mp10, M13 mp11 und pUC 12 kloniert. Die so erhaltenen Klone wurden jeweils durch Spaltung der aus Schnellaufschlüssen isolierten DNA charakterisiert und für Sequenzierungen verwendet. Eine Übersicht der Klonierungsstrategie ist in Abb. 4.2.-1 gegeben.

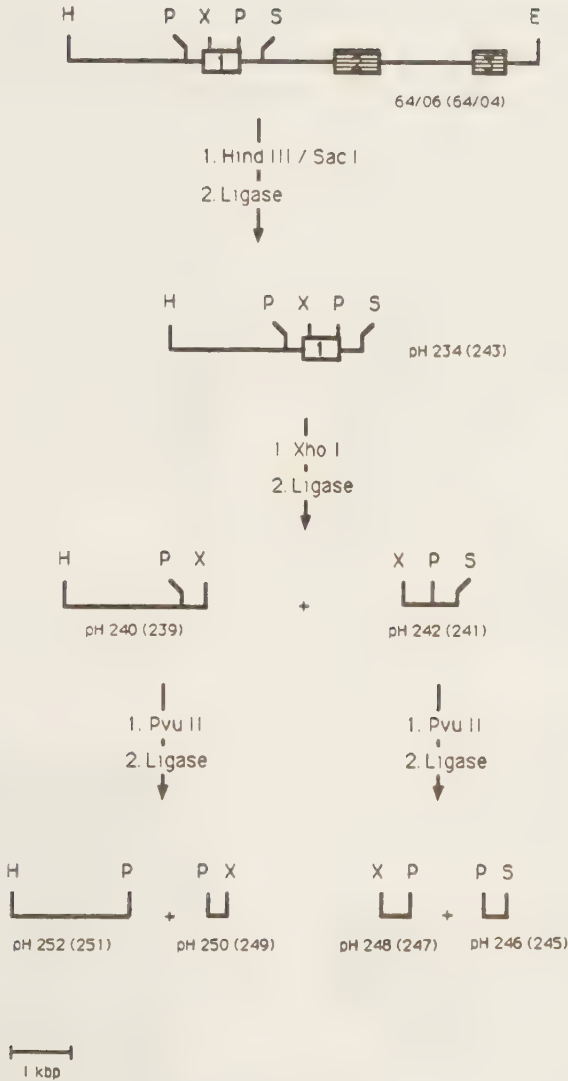


Abb. 4.2.-1: Klonierungsstrategie zur Sequenzierung des ersten Exons beider Allele (dem Phagen 64/04 entsprechenden Plasmide sind durch die in Klammern wiedergegebenen Nummern gekennzeichnet)

Als Ergebnis der Sequenzierungen konnten spezifisch für das Allel mit der Duplikation vier Punktmutationen an den Stellen 2727 (T→G), 2852 (C→G), 2920 (T→C) und 3090 (C→T) nachgewiesen werden (Abb. 4.2.-2a-d).

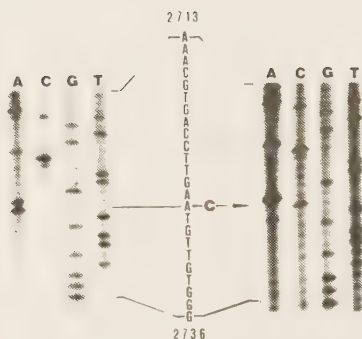


Abb. 4.2.-2a: Position 2727
(reverse Sequenz dargestellt)

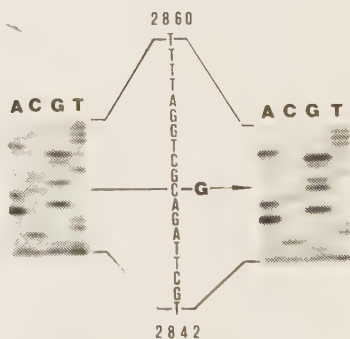


Abb. 4.2.-2b: Position 2852

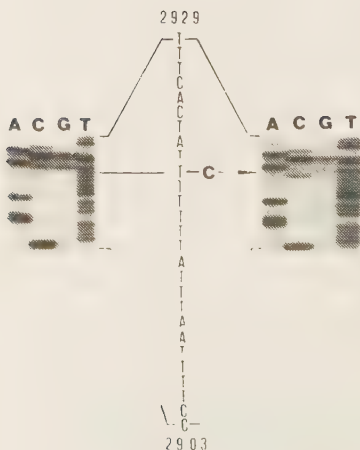


Abb. 4.2.-2c: Position 2920

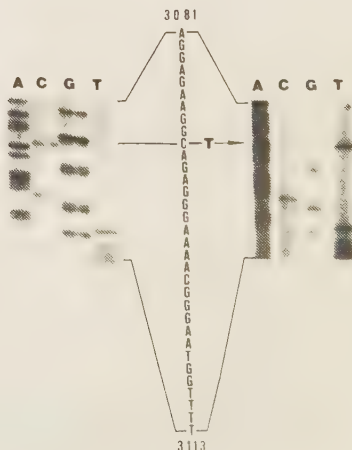


Abb. 4.2.-2d: Position 3090

Um nachzuprüfen, ob die Punktmutationen auf Ereignisse während der Subklonierungen zurückzuführen waren, wurden die Plasmide pH 234, pH 241, pH 242 und pH 243 sowie die Phagen 64/04 und 64/06 jeweils mit den Enzymen Eco RI und Hind III gespalten und nach Agarosegelelektrophorese auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die DNA wurde mit einer Oligonukleotidprobe hybridisiert (Abb. 4.2.-3a; von R. Mertz, Genzentrum München freundlicherweise zur Verfügung gestellt), welche die Punktmutation an Position 2727 überspannte. Die radioaktive Probe wurde stringent bei 48° C (theoretisch 44° C) abgewaschen. Nach Autoradiographie der Filter konnten Signale beobachtet werden, die spezifisch für den Phagen 64/06 und die davon abgeleiteten Plasmide pH 234 und pH 240 waren (Abb. 4.2.-3b).

3'-ACCTTGACTGTTGTG-5'

↑
T→G (2727)

Abb. 4.2.-3a: Sequenz des Oligonukleotides (s. Text)

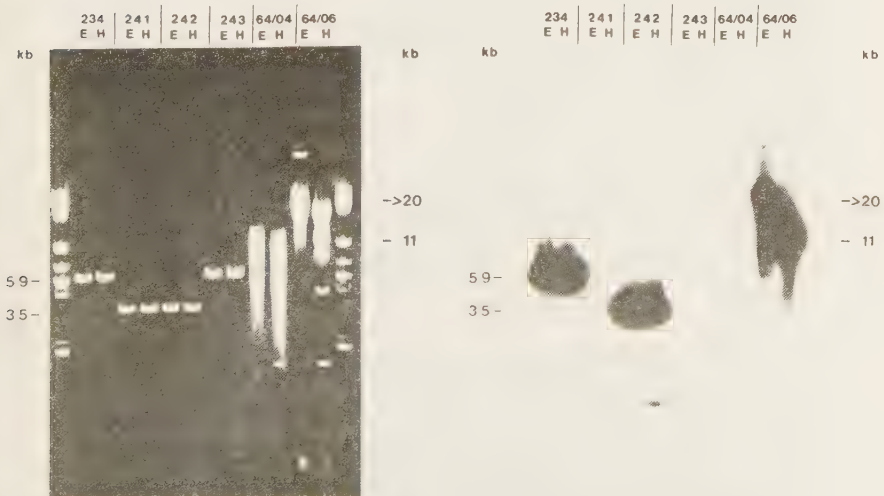


Abb. 4.2.-3b: Spaltmuster und Abb. 4.2.-3c: Autoradiographie zur Überprüfung der Punktmutation an Position 2727

Die Anhäufung von Punktmutationen in dem Allel, das die Duplikation aufweist, deutete an, daß dieses Allel transloziert wurde. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse einer *in-situ*-Hybridisierung von BL 64 - Chromosomen bestätigt, die von H. Hameister, Ulm durchgeführt wurde (s. 4.4.1.). Bei diesen Untersuchungen war auf Chromosom 8q⁺ ein stärkeres c-myc - spezifisches Signal zu erkennen, als auf dem Chromosom 8, sodaß auf Chromosom 8q⁺ mehr als eine Kopie des c-myc Gens angenommen werden konnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß spezifisch BL 64-RNA, nicht jedoch RNA aus anderen Zellen (z. B. IARC 549) mit dieser Oligonukleotidprobe hybridisierte, die spezifisch für die Punktmutation an Position 2727 war (Hartl und Lipp, 1986). Dadurch wurde die obige Annahme weiter unterstützt, da bekannt ist, daß in Burkitt-Lymphomen hauptsächlich das translozierte Allel transkribiert wird.

4.2.2. Aktivitätsvergleich der c-myc Promotoren beider Allele

Die Punktmutation an Position 2727 in dem c-myc Gen des Allels, das die Duplikation aufwies, eröffnete die Möglichkeit, den Einfluß dieser Mutation auf die Transkription zu untersuchen. Dazu ist der von Gorman et al., 1982 beschriebene experimentelle Ansatz gut geeignet. Verwendet wird dabei das bakterielle Gen für das Enzym Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), das in eukaryotischen Zellen nicht existiert. Verschiedene DNA-Sequenzen können vor das CAT-Gen kloniert werden und auf ihre Eignung als Promotoren in eukaryotischen Zellen hin überprüft werden. Nach der Transfektion der Konstrukte in diese Zellen werden nach einer bestimmten Zeitspanne die Proteine aus den Zellen isoliert und ein CAT-Aktivitätstest durchgeführt. Die Aktivität der CAT dient dabei als direktes Maß für die Stärke der Promotoren in den verwendeten Zellen.

Das für dieses Experiment verwendete Ausgangsplasmid pUC*CAT bestand aus dem CAT - Strukturgen, der SV 40 Polyadenylierungsstelle und dem Vektor pUC 12. In dieses mit Sma I linearisierte Plasmid wurde von beiden Allelen ein 0,9 kb großes Pvu II - Fragment, das den Promotorbereich und den größten Teil des ersten Exons

enthielt, vor das CAT-Gen kloniert. Die Fragmente wurden aus den Plasmiden pH 234 (D) und pH 243 nach Spaltung mit dem Enzym Pvu II über ein Agarosegel (1,28) isoliert. Die richtige Orientierung des insertierten Fragments wurde in den Plasmiden pmycCAT64*P bzw. dem der Duplikation entsprechenden Plasmid pmycCAT*P(D) durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Sma I mit nachfolgender Gelelektrophorese abgesichert. Diese Spaltkombination ließ je nach Richtung des insertierten Fragments unterschiedlich große Fragmentpaare entstehen. Die Aktivität der c-myc Promotoren wurde in Titrationsexperimenten bestimmt (Abb. 4.2.-4). Steigende Mengen der Plasmide pmycCAT64*P und pmycCAT*P(D) (C) wurden in BHK- und 143tk⁻-Zellen transfiziert. Als Träger-DNA wurde das Plasmid pUC 12 verwendet, um eine Gesamtmenge an DNA von 20 µg pro Platte zu erhalten. Beide Promotoren zeigten dabei eine ähnliche Aktivität, sowohl in BHK- (A) als auch in 143tk⁻-Zellen (B).

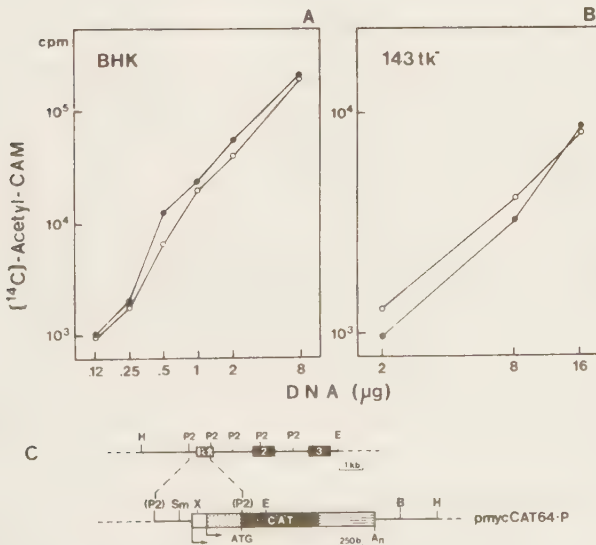


Abb. 4.2.-4: Ergebnis der Transfektionen der pmycCAT*P-Konstrukte

A bzw. B: Transfektion in BHK - bzw. 143 tk⁻ - Zellen; C: Struktur (offene Kreise: pmycCAT64*P; gefüllte Kreise: pmycCAT64*P(D) (Abbildung entnommen aus Lipp et al., 1986)

Da die unterschiedliche Expression der beiden Allele auch auf eine zellspezifische Eigenschaft der BL 64 - Zellen zurückzuführen sein konnte, wurden beide Plasmide auch in BL 64 Zellen transfiziert. Als Standard wurde das Plasmid pSV2CAT (Gorman et al., 1982) verwendet, es enthält den SV40 Promotor. Unterschiede zwischen den Plasmiden pmycCAT64*P und pmycCAT*P(D) waren jedoch auch in diesen Zellen nicht zu erkennen (Tab 4.2.-1). Die erhöhte Expression des translozierten Allels konnte daher nicht auf die Punktmutation an Position 2727 zurückgeführt werden. Durch diese Versuche wurde nicht ausgeschlossen, daß die anderen Punktmutationen bzw. die Punktmutationen zusammen mit Intronsequenzen einen Einfluß auf die Transkription des c-myc Gens haben.

Transfiziertes Konstrukt	¹⁴ C-Acetyl-CAM (cpm)	Prozent CAT-Aktivität
pSVCAT	3096 ± 440	100
pmycCAT-P	235 ± 62	8
pmycCAT-P(D)	247 ± 105	8

Tab. 4.2.-1: Transfektion der pmycCAT*P-Konstrukte in BL 64 - Zellen, die Aktivität und die Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen Transfektionen bestimmt, wobei jeweils 800 µg Protein des zellulären Extraktes verwendet wurden

4.3. Einfluß des Cκ-Enhancers auf die c-myc Expression

In allen bisher untersuchten Burkitt-Lymphomen wurde eine erhöhte Menge c-myc spezifischer RNA festgestellt. Um diesen experimentellen Befund zu erklären, wurden verschiedene Ursachen angenommen, wie z.B. eine Verlängerung der Halbwertszeit der c-myc RNA oder eine erhöhte Transkriptionsrate des c-myc Gens. Die erhöhte Transkriptionsrate könnte auf eine Veränderung der Chromatin-

struktur, auf eine strukturelle Änderung des Promotorbereichs oder auf den Einfluß von Enhancern zurückzuführen sein. In einigen wenigen Fällen konnte dies auch experimentell bestätigt werden. Bei den varianten Translokationen wird zwar der C κ -Enhancer in den 3'-Bereich des c-myc Gens transloziert, ist jedoch sehr weit vom c-myc Gen entfernt. Einen Einfluß des Enhancers auf die erhöhte c-myc Expression zu zeigen, war bei den varianten Translokationen bis jetzt noch nicht möglich. Zudem war unklar, über welche Distanz hinweg der C κ -Enhancer wirken kann und welche Promotoren und zusätzliche Sequenzen - neben den natürlichen - einem Einfluß zugänglich sind. Vom Enhancer der schweren Kette wurde angenommen, daß sich sein Einfluß über mindestens 17,5 kb erstreckt (Wang und Calame, 1985), für den C κ -Enhancer lagen ähnliche Untersuchungen nicht vor.

4.3.1. Konstruktion der c-myc / CAT / C κ -Fusionsplasmide

Um den Einfluß des C κ -Enhancers auf die c-myc Promotoren zu testen, wurden Fusionsplasmide konstruiert, die neben unterschiedlichen Promotor-Regionen des c-myc Gens den C κ -Enhancerbereich und das CAT-Gen im Vektor pUC 12 enthielten. Aus dem C κ -Bereich wurde das 2,0 kb große Sac I / Sac I - Fragment ausgewählt, dessen Deletion im C κ -Bereich eine 15fache Verringerung der Expression des menschlichen K-Immunglobulins bewirkt (Potter et al., 1984). Dieses Fragment wurde aus dem Plasmid pH 263/5 mit dem Enzym Sac I herausgespalten, und über ein Agarosegel (0,8%) isoliert. Verschiedene Konstrukte, die sich im Promotorbereich des c-myc Gens unterschieden (Lipp et al., 1987) wurden ebenfalls mit Sac I linearisiert und als Vektoren verwendet. Sie enthielten Bereiche des nichttranslozierten c-myc Gens der Raji Zelllinie. Die Insertion des Enhancers war in zwei Orientierungen möglich, die durch Spaltung der Klonierungsprodukte mit dem Enzym Hind III unterschieden werden konnten. Dieses Enzym spaltet das insertierte Sac I / Sac I - Fragment unsymmetrisch und besitzt im Vektor eine konstante Schnittstelle, daher entstanden je nach Orientierung unterschiedliche Fragmentpaare. Für die nachfolgenden CAT-Aktivitätstests wurden die Orientierungen des Enhancers verwendet, die der Situation in den translozierten BL 64 - Zellen entsprach, als Standard wurde das Plasmid pSV2CAT transfiziert (Abb. 4.3.-1).

Neben einem Konstrukt, das beide *c-myc* Promotoren enthielt (pmycCAT*R1(κ)), wurden auch solche verwendet, bei denen einer der beiden Promotoren deletiert war (pmycCAT*R1ΔP1(κ) und pmycCAT*R1ΔP2(κ)). Anhand dieser Konstrukte sollte geprüft werden, ob ein unterschiedlicher Einfluß des Cκ-Enhancers auf die beiden *c-myc* Promotoren vorliegt, da eine unterschiedliche Benutzung der Promotoren in Burkitt-Lymphomen, verglichen mit normalen Zellen, häufig festzustellen ist. Normalerweise wird der zweite Promotor stärker benutzt als der erste, in Burkitt-Lymphomen ändert sich das Verhältnis zugunsten des ersten Promotors.

4.3.2 CAT-Test der Plasmide in BL 64 - Zellen

Anhand dieser Experimente sollte festgestellt werden, ob der Cκ-Enhancer in BL 64 - Zellen, in denen er mit dem *c-myc* Genort verknüpft vorliegt, die *c-myc* Promotoren beeinflusst. Die Ergebnisse des CAT-Aktivitätstests sind neben den einzelnen Konstrukten wiedergegeben (Abb. 4.3.-1). Es konnten in den transfizierten BL 64 - Zellen jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression des CAT-Gens zwischen Konstrukten, die den Enhancer enthielten und dem Kontrollkonstrukt festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Aktivitäten der Konstrukte pmycCAT*R1, pmycCAT*R1(κ), pmycCAT*R1ΔP1(κ) und pmycCAT*R1ΔP2(κ) lagen innerhalb der Fehlergrenze. Die geringere Aktivität des Konstrukts mit dem zweiten Promotor (pmycCAT*R1ΔP1(κ)) gegenüber dem Konstrukt, das nur den ersten Promotor enthielt (pmycCAT*R1ΔP2(κ)) spiegelt die Situation der meisten Burkitt-Lymphom - Zellen wieder, in denen meistens der erste Promotor stärker benutzt wird als der zweite. Die Kontrolltransfektion mit dem Konstrukt pSV2CAT zeigte, daß die Transfektion erfolgreich verlief und die geringen Aktivitätsunterschiede zwischen den anderen Konstrukten nicht auf technische Mängel zurückzuführen waren.

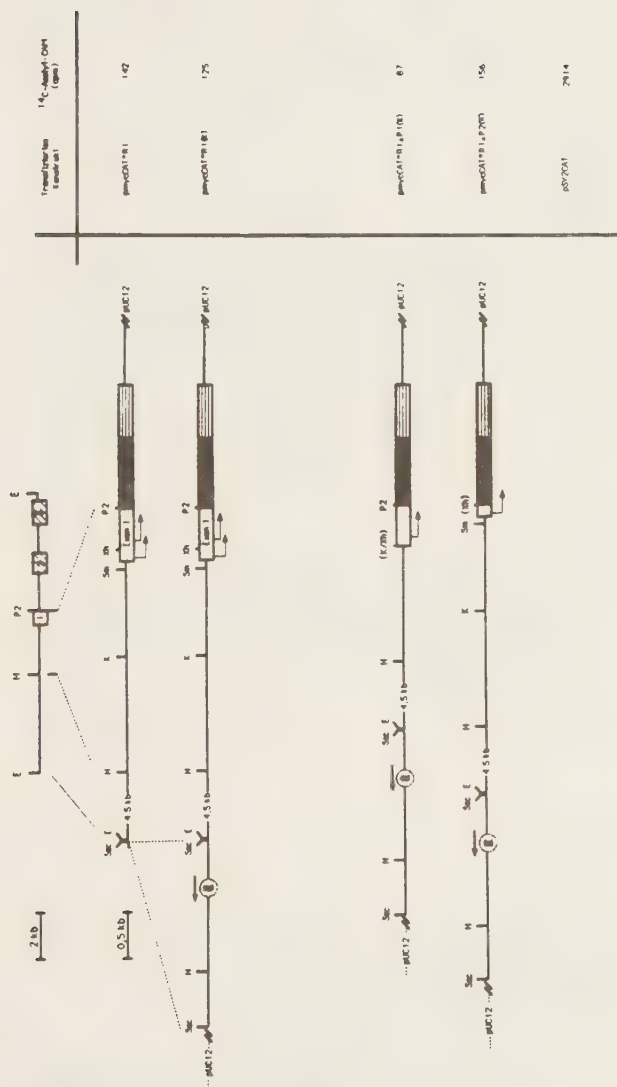


Abb. 4.3.-1: Struktur der CAT-Konstrukte und Ergebnis der Transfektion
(Struktur des Plasmids pSV2CAT ist nicht dargestellt; E: Eco RI; H: Hind III;
K: Kpn I; P2: Pvu II; Sm: Sma I; Xh: Xho I)

4.4. Struktur des funktionellen κ -Immunglobulins

Es lagen zwei Phagen, 64/02 und 64/03, vor (Hartl, 1984), die beide mit J κ - und C κ -Proben hybridisierten, mit einer V κ -Probe hybridisierte dagegen nur der Phage 64/02. Um nachzuprüfen, ob mit ihm tatsächlich das funktionelle Allel isoliert worden war, wurde der κ -Bereich sequenziert. Dazu wurde die Phagen-DNA mit Sac I gespalten, wobei eine Doppelbande bei 2 kb entstand. Beide Fragmente wurden zusammen über ein Agarosegel isoliert und in einen mit Sac I vorbehandelten pUC12 - Vektor kloniert. Die Klone enthielten entweder das Sac I - Fragment, das den C κ -Enhancer und das Intron zwischen J5 und C κ enthielt, oder das Fragment, in dem der V κ -Teil lokalisiert war. Da nur in letzterem Fragment eine Hind III - Schnittstelle enthalten war, konnten beide Arten der Klone durch Spalten der Schnellaufschluß-DNA mit den Enzymen Sac I und Hind III leicht auseinandergehalten werden. Der Klon pH 256/4, der den V κ -Anteil enthielt, wurde mit Restriktionsenzymen genauer kartiert (Abb. 4.4.-1).

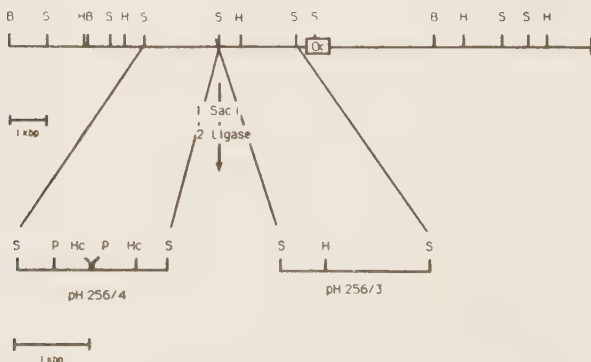


Abb. 4.4.-1: Subklonierung des V κ -Gens

(B: Bam HI; H: Hind III; Hc: Hinc II; P: Pst I; S: Sac I)

Nach Spaltung von pH 256/4 jeweils mit den Enzymen Hinc II und Pst I wurden die dabei entstehenden Fragmente über ein Agarosegel isoliert. Fragmente, welche noch den Vektoranteil enthielten wurden religiert, die anderen Fragmente wurden in entsprechend vorbehandelte pUC12 - Vektoren kloniert (s. Abb. 4.4.-2).

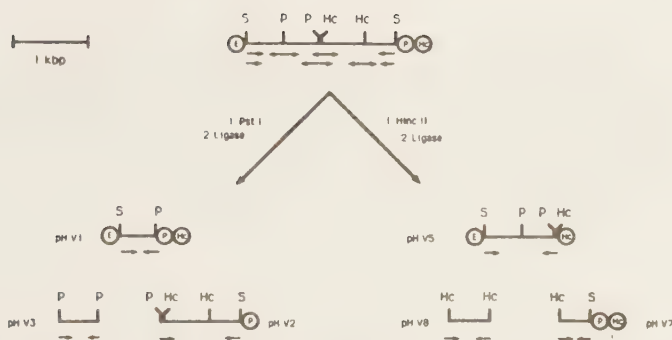


Abb. 4.4.-2: Sequenzierungsschema des Vκ-Genbereichs

(Symbole wie in Abb. 4.4.-1; Pfeile geben die Sequenzierungsrichtung an)

Die Klonierung wurde durch Spaltung der Schnellaufschluß-DNA einiger Klone kontrolliert, die DNA positiver Klone wurde zur Sequenzierung verwendet. Jeder der Klone wurde in beide Richtungen sequenziert (Abb. 4.4.-2). Der Phage 64/02 enthielt demnach ein funktionell rearrangiertes κ -Gen der Subgruppe I (Pech et. al, 1984), das mit seiner kodierenden Region 3 (CDR 3) mit J4 verknüpft worden war. Eine Aussage darüber, ob das Vκ-Gen durch Mutationen verändert war, erlaubten die Vergleichssequenzen von fünf anderen Genen dieser Subgruppe nicht, da die einzelnen Sequenzen stark voneinander abwichen (Pech et al., 1984). Das Vκ-Gen von 64/02 enthielt die dc-Box und den normalen Promotor dieser Subgruppe (Abb. 4.4.-3a).

```

      Pst I
1 -CTGCAGCTGTGCCCAAGCCTGCCCTATCCCTGC TGATTTCAT GTTCGCA 50
                                     dc-box

51 GAGCACAGCCCCCTGCCCTGAAGATTCTTAATA TTAATA GGCTGGTCCGACCCCTGT- 100
                                     Promotor
  
```

Abb. 4.4.-3a: Promotorbereich des Vκ-Gens

Es ist nur der Bereich dargestellt, der die dc-box und den Promotor enthält

Die Verbindung zu J4 erfolgte unter Erhaltung des Leserahmens (Abb. 4.4-3b). Im kodierenden Teil des J-Gens traten zwei Mutationen auf, von denen die Mutation an Position 1287 (Hieter et al., 1982) keine Änderung der Aminosäuren zur Folge hatte, die Mutation an Position 1297 bewirkte einen Austausch von Arg zu Gly.

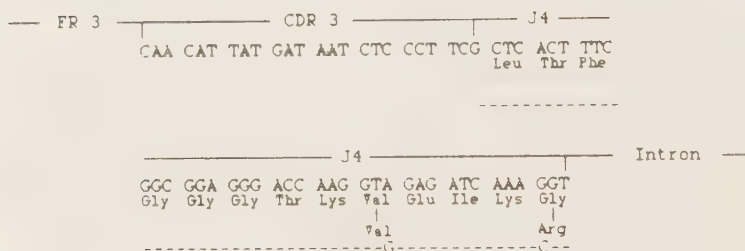


Abb. 4.4.-3b: V-J-Fusionsbereich mit dem veränderten J4-Gen, die gestrichelte Linie stellt die J4-Keimbahnsequenz dar, soweit sie mit J4 aus pH 256/4 übereinstimmt

4.5. Analyse der BL 64 - Chromosomen

4.5.1. *In-situ* -Hybridisierungen der translozierten Chromosomen

Die Ergebnisse der *in-situ* -Hybridisierung der BL 64 Chromosomen $8q^+$ und $2p^-$, die von H. Hameister, Ulm durchgeführt wurden, sind bereits veröffentlicht (Hameister et al., 1986) und sollen hier nur als Einführung in die nächsten Kapitel zusammenfassend dargestellt werden (Abb. 4.5.-1), da sie zum einen als Ausgangspunkt verschiedener Experimente dienen, zum anderen Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen oder unterstützen.

BL 64

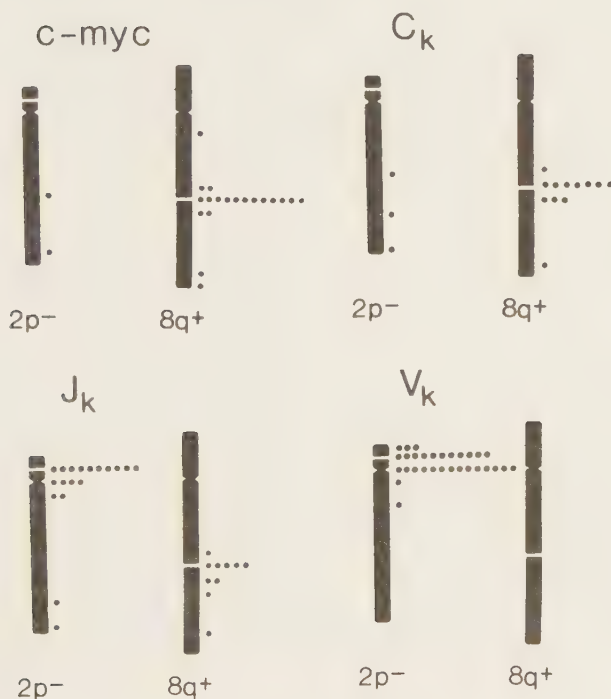


Abb. 4.5.-1: *in situ*-Hybridisierung der BL 64 Chromosomen 8q⁺ und 2p⁻
(Punkte geben die relative Stärke der Hybridisierung wieder)

Mit einer 3'-*c-myc* Probe (s. 4.1.1), die das dritte Exon enthielt, hybridisierte nur Chromosom 8q⁺, nicht jedoch Chromosom 2p⁻. Dies bedeutete, daß das *c-myc* Gen auf Chromosom 8q⁺ verblieb. Mit einer C_k-Probe hybridisierten die Chromosomen 8q⁺ sowie 2 (nicht dargestellt) und mit einer J_k-Probe die Chromosomen 8q⁺, 2p⁻ und 2. Da auf Chromosom 8q⁺ keine V_k-Sequenzen nachgewiesen werden konnten, wurde angenommen, daß der Bruchpunkt im J_k-Bereich lag.

4.5.2. 'Southern-Blot'-Analysen von BL 64 - DNA mit J κ - und C κ -spezifischen Proben

DNA aus BL 64 Zellen wurde mit dem Enzym Bam HI gespalten, jeweils 20 μ g wurden nach Auftrennung durch Gelelektrophorese auf Nitrocellulosefilter transferiert und gegen J κ - und C κ -spezifische Proben hybridisiert. Die Autoradiographien ließen bei der J κ -Hybridisierung drei Banden der Größe 7,5 kb, 8 kb und 9 kb erkennen (Abb. 4.5.-2), bei der C κ -Hybridisierung dagegen nur zwei Banden der Größe 8 kb und 9 kb (Abb. 4.5.-3). Da die Fragmente mit den Größen 8 kb und 9 kb mit beiden Proben hybridisierten und mit den Strukturen der Phagen 64/02 und 64/03 zu erklären waren, war mit der Bande bei 7,5 kb der J-Bereich auf Chromosom 2p⁻ erfaßt worden.

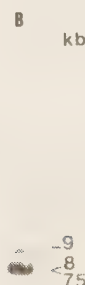


Abb. 4.5.-2: J κ -Hybridisierung

Abb. 4.5.-3: C κ -Hybridisierung

von BL 64 - DNA (B: Bam HI)

4.5.3. Charakterisierung des 3'-c-myc Genbereichs

Die oben angeführten Resultate der *in situ* - Hybridisierung von BL 64 - Chromosomen, die zeigten, daß das c-myc Gen auf Chromosom 8q⁺ verblieb, ließen den Bruchpunkt in 3'-Richtung des c-myc Gens erwarten, da das c-myc Gen auf Chromosom 8 mit seinem 5'-Ende zum Zentromer hin gerichtet ist. Zu Beginn dieser Arbeit waren weder publizierte Daten noch Subklone aus einem größeren 3'-Bereich des c-myc Gens verfügbar. Deshalb sollte durch Anwendung der 'chromosomal-walking'-Technik ein möglichst großer Bereich charakterisiert werden, der auch eine Aussage über eine Entfernung des c-myc Gens vom Bruchpunkt erlaubte. Dies war von Interesse, da auch in anderen Fällen varianter Translokationen eine erhöhte c-myc Genexpression zu beobachten ist. Sie wurde auf einen Einfluß des Immunglobulinogenortes zurückgeführt, obwohl nicht bekannt war, über welche Entfernung hin die beiden Genorte verknüpft sind.

Ausgehend vom Phagen 64/04, dessen Isolierung und Charakterisierung bereits beschrieben wurde (Hartl, 1984), konnten nach Spaltung der Phagen-DNA mit den Enzymkombinationen Eco RI / Bam HI (E/B) und Sal I / Bam HI (S/B) Fragmente der Größe 7,5 kb (E/S) und 3,1 kb (S/B) über ein Agarosegel (0,9%) isoliert und in entsprechend vorbehandelte pUC 12 - Vektoren kloniert werden. Die Klonierung wurde durch Spaltung der Schnellaufschluß-DNA einiger der erhaltenen Klone überprüft, die Klone pH 216/1 (E/B) und pH 215/12 (S/B) wurden mit Restriktionsenzymen kartiert und zur Anfertigung weiterer Subklone verwendet.

Das Plasmid pH 215/12 wurde mit den Enzymkombinationen Bam HI / Bgl II und Hind III / Sal I gespalten, um die jeweils 0,6 kb großen Fragmente zu isolieren und in entsprechend vorbehandelte Vektoren zu klonieren, wobei ausgenutzt wurde, daß bei Bgl II - Spaltungen Bam HI - kompatible Enden entstehen. Daraus wurden nach Charakterisierung der Schnellaufschluß-DNA die Klone pH 220/1 und 219/1 gewonnen. Die Fragmente wurden ausgewählt, da sie nicht mit radioaktiv markierter BL 64 - DNA hybridisierten, also repetitionsfrei waren. Dies war eine Voraussetzung, um mit ihnen 'Southern-Blot' - Analysen durchzuführen und sie zum

chromosomalen Wandern zu verwenden. Das Klonierungsschema und die Ergebnisse der Kartierungen sind zusammenfassend in Abb. 4.5 - 4 wiedergegeben. Das Plasmid pH 219/1, das Sequenzen vom äußersten 3'-Ende des Phagen 64/04 enthielt, wurde verwendet, um in einer BL 64 - Genbank nach weiteren Phagen zu suchen, die mit dieser Probe spezifisch reagierten.

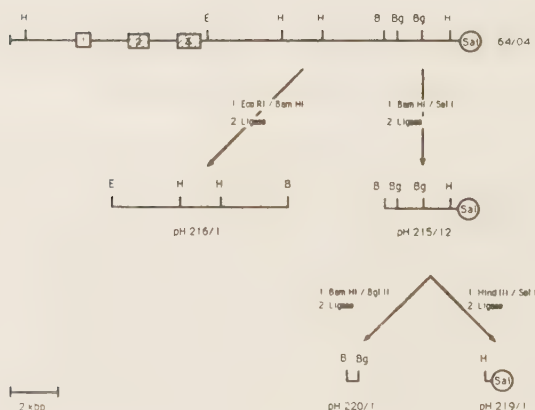


Abb. 4.5.-4: Subklonierungsschema ausgehend von 64/04
 (B: Bam HI; Bg: Bgl II; E: Eco RI; H: Hind III; S (im Kreis):
 Sal I - Schnittstelle im Poylinker)

Dazu wurden 1×10^6 -Phagen auf dem E.coli - Stamm K803 ausplattiert; von den Platten wurden Nitrocellulosefilterabzüge angefertigt und gegen das radioaktiv markierte Plasmid pH 219/1 hybridisiert. Nach der Plaquereinigung blieb ein Phage übrig, der spezifisch mit dieser Probe reagierte. Die nach 3.4.6. isolierte DNA wurde mit den Enzymen Bam HI (B), Eco RI (E), Hind III (H) und Sal I (S) sowie mit Kombinationen dieser Enzyme kartiert (Abb. 4.5.-5a). Die Analyse dieser Spaltungen ergab eine Länge der klonierten DNA von 15,8 kb, die Struktur ist in Abb. 4.5.-5b dargestellt. Der Phage 64/15 überlappte mit dem Phagen 64/04 knapp, mit ihm wurden weitere 15 kb des 3'-Genbereichs erschlossen.

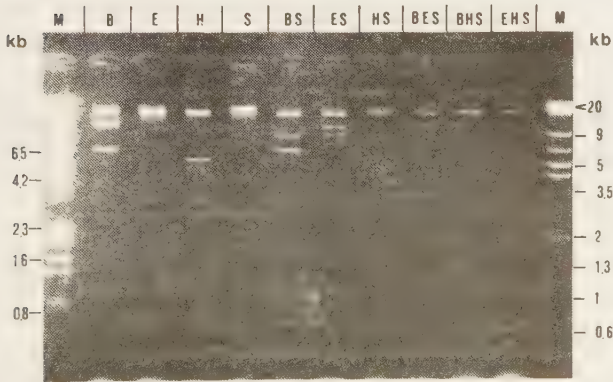


Abb. 4.5. 5a: Spaltmuster der 64/15 - DNA
(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; S: Sal I; M: Marker-DNA)

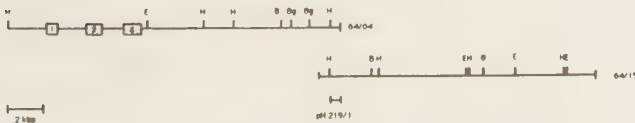


Abb. 4.5.-5b: Struktur der Phagen 64/04 und 64/15
(Symbole wie in Abb. 4.5.-4 bzw. 4.5.-5a)

Die DNA des isolierten Phagen 64/15 wurde mit den Enzymkombinationen Eco RI / Sal I (E/S) und Bam HI / Sal I (B/S) gespalten. Das durch die E/S-Spaltung entstandene 1,5 kb große Fragment, das das 3'-Ende des Phagen 64/15 repräsentiert, wurde über ein Agarosegel (0,9%) isoliert und in einen mit E/S vorbereiteten pUC 12 Vektor kloniert. Der Klon pH 230/1 (Abb. 4.5.-6a) enthielt das Fragment, wie durch Spaltung seiner Schnellaufschluß-DNA mit den Enzymen Eco RI und Sal I gezeigt wurde.

Durch die B/S - Spaltung entstanden drei Fragmente der Größen : 3 kb (B/S, es repräsentiert das 5'- Ende des Phagen), 6,5 kb (B/B) und 6,3 kb (B/S, 3'-Ende). Die Fragmente wurden nach Hitzeinaktivierung der Enzyme direkt aus dem Spaltansatz unter Verwendung Bam HI und Bam HI / Sal I geschnittener pUC 12 - Vektoren kloniert. Durch Charakterisierung der Schnellaufschluß-DNA konnten Klone, die eines der beiden B/S - Fragmente enthielten, voneinander unterschieden werden. Dabei wurden die Klone pH 231/1 (6,3 kb B/S), pH 232/1 (6,5 kb B/B) und pH 233/1 (3 kb B/S) erhalten, das Schema ihrer Klonierung und das Ergebnis ihrer Kartierung ist in Abb. 4.5.-6a dargestellt.

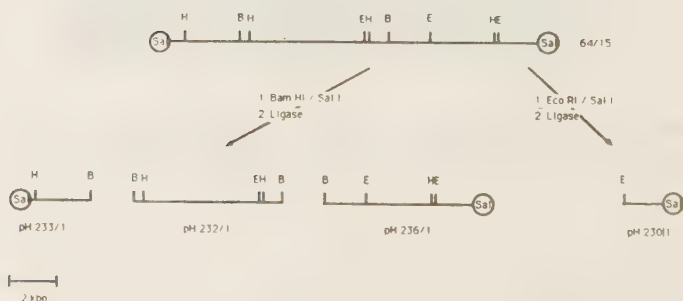


Abb. 4.5.-6a: Subklonierungsschema ausgehend von 64/15
(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; S (im Kreis):
Sal I - Schnittstelle im Polylinker)

Die Analyse des Klon pH 230/1 ergab, daß ein 0,7 kb großes Pst I / Pst I - Fragment repetitionsfrei war. Nach Spaltung des Plasmids mit dem Enzym Pst I wurde das repetitionsfreie Fragment über ein Agarosegel (1%) isoliert und in einen entsprechend vorbehandelten pUC 12 - Vektor kloniert. Der so gewonnene Klon pH 235/1 (Abb 4.5.-6b) wurde zu einer weiteren Analyse des 3'-Bereichs herangezogen (s.u.).

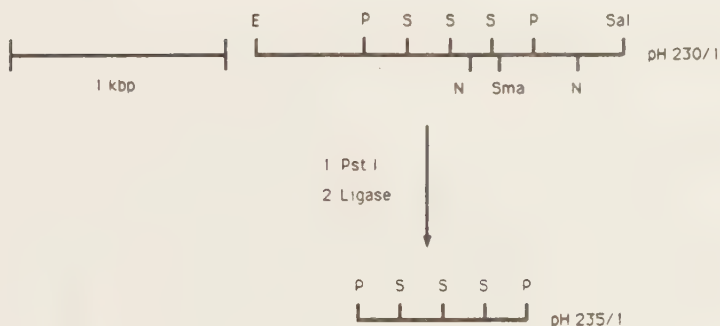


Abb. 4.5.-6b: Subklonierung von pH 235/1
(E: Eco RI; N: Nco I; P: Pst I; S: Sac I)

Da die Plasmide pH 230/1 und 232/1 noch repetitive Sequenzen enthielten, wurden sie weiter verkürzt. Die Charakterisierung des Plasmids 232/1 ergab, daß das 0,8 kb große Bam HI / Hind III Fragment repetitionsfrei war. Dieses Plasmid wurde mit dem Enzym Hind III gespalten und das dabei entstehende 3,5 kb große Fragment isoliert. Es enthielt den Vektor pUC 12 und das 0,8 kb große repetitionsfreie Fragment, die über die Bam HI - Stelle verbunden waren. Nach Religierung des 3,5 kb großen Fragments konnte der Klon pH 244/1 erhalten werden, der nur noch das repetitionsfreie Fragment enthielt (Abb. 4.5.-6c).

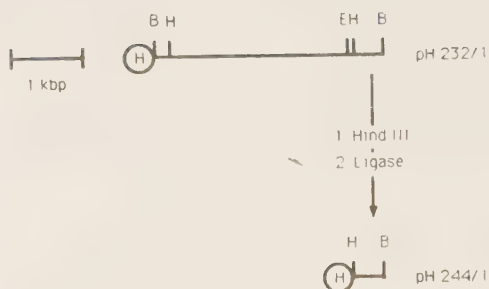


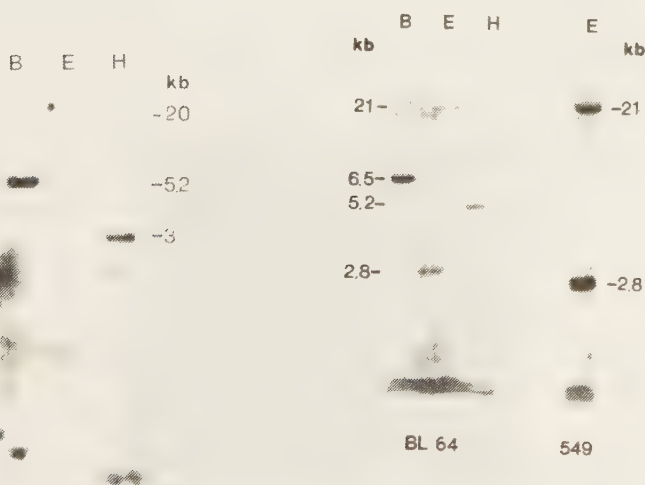
Abb. 4.5.-6c: Subklonierung von pH 244/1

(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III, im Kreis ist die Schnittstelle des Polylinkers dargestellt)

Mit den Plasmiden pH 219/1 und pH 244/1 wurde genomische BL 64 - DNA hybridisiert, von der jeweils 15 µg der DNA mit den Enzymen Bam HI, Eco RI und Hind III gespalten und - nach Auftrennung über ein Agarosegel (0,6%) - auf ein Nitrocellulosefilter transferiert worden waren. Durch diese Experimente sollten die Strukturen der Phagen 64/04 und 64/15 überprüft werden, indem die Fragmentlängen, die sich aus den Kartierungen ergeben, mit den Längen der hybridisierenden Fragmente verglichen wurden. Die Autoradiographie der Hybridisierung mit dem Plasmid pH 219/1 zeigt jeweils nur ein Fragment (Abb. 4.5.-7a), die der Größe nach mit den Strukturen der Phagen 64/04 und 64/15 übereinstimmen.

Die Autoradiographie der Hybridisierung mit dem Plasmid pH 244/1 ließ neben den einzelnen Banden bei der Bam HI - und Hind III - Spaltung zwei positive Banden in der Eco RI - Spur erkennen, von denen die Bande bei ca. 20 kb der erwarteten Struktur entsprach, nicht jedoch die Bande bei 3 kb (Abb. 4.5.-7b). Dies konnte entweder auf einen Polymorphismus bezüglich der Eco RI - Schnittstelle oder auf das Translokationsereignis zurückzuführen sein, das ein unterschiedlich großes neues Eco RI - Fragment erzeugte, aber neue Bam HI - und Hind III - Fragmente, die sich der Größe nach nicht von den normalen Fragmenten unterschieden. Diese Möglichkeiten konnten durch eine 'Southern-Blot'-Analyse von DNA aus IARC 549 -

Zellen unterschieden werden. DNA aus dieser Vergleichslinie des BL 64 - Patienten wurde mit Eco RI gespalten und - wie oben bereits beschrieben - mit pH 244/1 hybridisiert, das Ergebnis der Autoradiographie ist in Abb.4.5.-7c dargestellt. Da bei beiden Zellarten das selbe Hybridisierungsmuster auftritt, ist demgemäß ein Restriktionsenzym polymorphismus verantwortlich für die beiden positiv hybridisierenden Eco RI - Fragmente. Der Polymorphismus wurde in dem Hybridisierungsexperiment mit pH 219/1 nicht sichtbar, weil die Auflösung zwischen Banden der Größe 18 kb und 21 kb bei der verwendeten Agarosekonzentration nicht möglich war.



A **B**
 Abb. 4.5.-7: Southern-Blot-Analysen mit den Plasmiden pH 219/1 und pH 244/1
 A: BL 64 - DNA mit pH 219/1
 B: BL 64 - und IARC 549 - DNA mit pH 244/1

Mit dem Plasmid pH 235/1 wurde in der BL 64 - Genbank nach weiteren Klonen gesucht, die spezifisch damit hybridisierten. Es wurde dabei in der für das Plasmid pH 219/1 beschriebenen Weise verfahren (s.o.). Nach der Plaquereinigung über drei Runden blieben sechs Phagen übrig, von denen zwei mit zwei weiteren identisch

waren, einer hatte die Struktur des Phagen 64/15, von dem ausgegangen wurde, sodaß insgesamt drei neue Klone isoliert wurden, von denen der Phage 64/19 (Spaltmuster: Abb. 4.5.-8a) weitere 17 kb des 3'-c-*myc* Genbereichs enthielt. Sie hatten untereinander überlappende Bereiche, ihr Bezug zu pH 235/1 und 64/15 sowie das Ergebnis ihrer Kartierung ist in Abb. 4.5.-8b dargestellt. Der Phage 64/16, der mit seinem 5'-Bereich am weitesten mit dem 3'-Bereich des Phagen 64/15 überlappt, enthält die zusätzliche *Eco* RI - Schnittstelle, die bei der Hybridisierung mit pH 244/1 entdeckt wurde (s.c.), sie ist in Klammern angedeutet. In den überlappenden Bereichen stimmen die Strukturen der Phagen sonst überein.

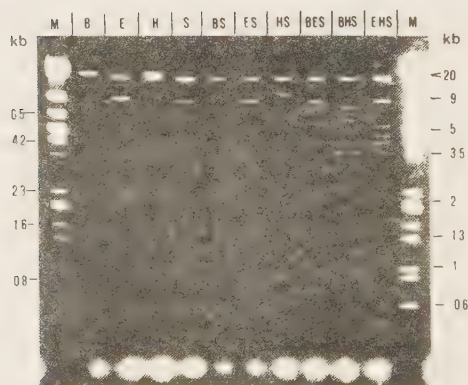


Abb. 4.5.-8a: Spaltmuster von 64/19
(B: Bam HI; E: *Eco* RI; H: Hind III; S: Sal I; M: Marker-DNA)

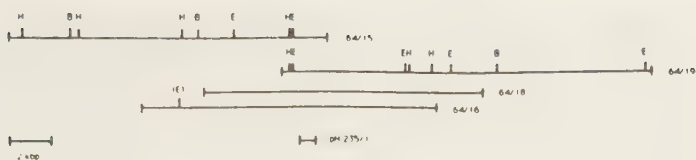


Abb. 4.5.-8b: Struktur der mit pH 235/1 isolierten Phagen
im Vergleich mit 64/15 (Symbole wie in Abb. 4.5.-8a)

Um diesen Phagen genauer zu charakterisieren und um von ihm repetitionsfreie Subklone zu erhalten, wurde seine DNA mit den Enzymen Bam HI und Sal I gespalten. Dabei entstanden ein 8,0 kb großes Fragment (B/B), das den 3'-Bereich des Phagen repräsentiert, und ein 11 kb großes Fragment (B/S), in dem der 5'-Anteil der Phagen-DNA enthalten ist. Beide Fragmente wurden nach Hitzeinaktivierung der Enzyme aus dem Spaltansatz heraus zur Klonierung unter Verwendung von pUC 12-Vektoren kloniert. Durch Analyse der Schnellaufschluß-DNA verschiedener Klone konnten die Klone pH 254/1 (8 kb B/B) und 255/12 (11 kb B/S) erhalten werden. Die genaue Struktur, die durch Kartierung bestimmt wurde sowie das Klonierungsschema sind in Abb. 4.5.-9 wiedergegeben.

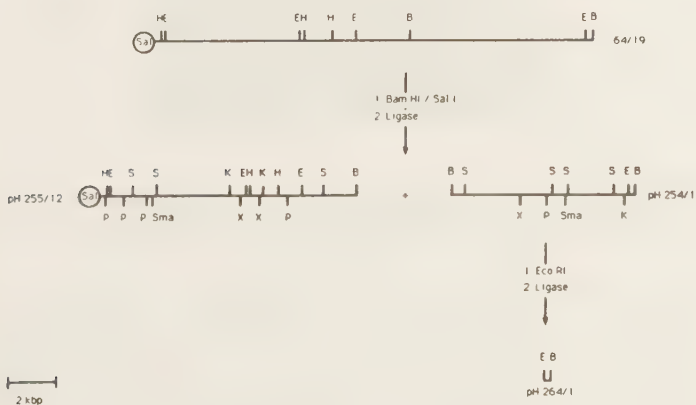


Abb. 4.5.-9: Subklonierungsschema ausgehend von 64/19
(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; K: Kpn I; P: Pst I; S: Sac I; X: Xho I)

Im Plasmid pH 255/12 war bei allen Kombinationsspaltungen nur das Pst I / Pst I - Fragment repetitionsfrei, das bereits mit pH 235/1 kloniert vorlag. Das Plasmid pH 254/1 enthielt am 3'-Ende das repetitionsfreie 0,8 kb große Bam HI / Eco RI - Fragment. Dieses Fragment wurde nach Spaltung mit dem Enzym Eco RI aus einem Agarosegel isoliert und in einen entsprechend vorbereiteten pUC 12 - Vektor kloniert. Der Klon pH 264/1 (Abb. 4.5.-9) enthielt das Fragment, dies wurde durch Analyse seiner Schnellaufschluß-DNA kontrolliert.

Mit diesem Plasmid wurde in der BL 64 - Genbank erneut nach Phagen gesucht, die einen weiteren 3'-Genbereich enthielten. Gefunden wurden dabei drei Phagen, von denen einer dem bereits vorliegenden Phagen 64/19 entsprach. Ihre Isolierung und ihre Kartierung mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Eco RI, Hind III und Sal I wurde in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Die Strukturen der beiden anderen Phagen und ihr Bezug zum Phagen 64/19 und dem Plasmid pH 264/1 sind in Abb. 4.5.-10a dargestellt.

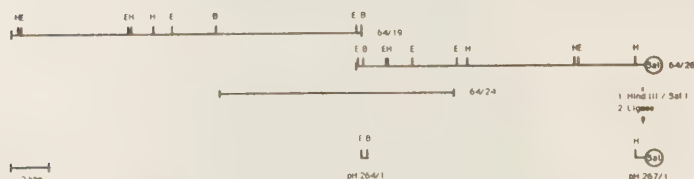


Abb. 4.5.-10a: Struktur der mit pH 264/1 isolierten Phagen im Vergleich mit 64/19 (B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; die Sal I - Schnittstelle des Polylinkers ist im Kreis dargestellt)

Der Phage 64/26 überlappt mit dem Ausgangsphagen 64/19 (Spaltmuster: Abb. 4.5.-10b) nur knapp und enthält weitere 15 kb aus dem 3'-Genbereich. Mit diesen beiden Phagen überlappt der Phage 64/24 in größeren Bereichen, strukturelle Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Die Überprüfung des Phagen 64/26 auf repetitive Sequenzen, die mit einem 'Southern-Blot' seiner gespaltenen Schnellaufschluß-DNA durchgeführt wurde, ergab, daß nur das 0,7 kb große Hind III / Sal I - Fragment frei von Repetitionen war. Dieses Fragment wurde

nach Spaltung eines Teils der Schnellaufschluß-DNA (ca. 3-5 µg) und Isolierung aus einem Agarosegel (1%) in einen entsprechend vorbehandelten pUC 12 -Vektor kloniert (Abb. 4.5.-10a). Die Klonierung wurde durch Analyse der Schnellaufschluß-DNA des Klons pH 267/1 kontrolliert, der dieses Fragment enthielt. Mit den Klonen pH 235/1, pH 264/1 und pH 267/1 wurde genomische, mit Bam HI, Eco RI und Hind III gespaltene BL 64 - DNA hybridisiert, so wie es bereits für die Klone pH 219/1 und pH 244/1 beschrieben worden ist (s.o.).

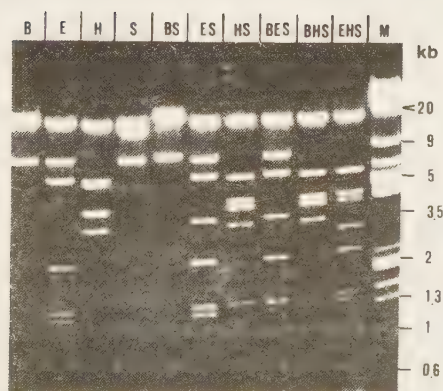


Abb. 4.5.-10b: Spaltmuster des Phagen 64/26
(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; S: Sal I; M: Marker-DNA)

Es trat bei jeder Spaltung nur jeweils eine Bande auf (Abb. 4.5.- 11a,b und c), die im Fall der Plasmide pH 235/1 und pH 264/1 der erwarteten, aus den Strukturen der Phagen 64/19 und 64/26 berechneten Größe entsprachen. Die Autoradiographie der Hybridisierung mit pH 267/1 zeigte ebenfalls nur eine Bande pro Spaltung, die Länge der hybridisierenden Fragmente konnte jedoch nicht mit einer Phagenstruktur verglichen werden, da mit Isolierung des Klon 64/26 das chromosomale Wandern beendet wurde. Diese Ergebnisse zeigten, daß der Bruchpunkt nicht in dem isolierten DNA-Bereich liegt.

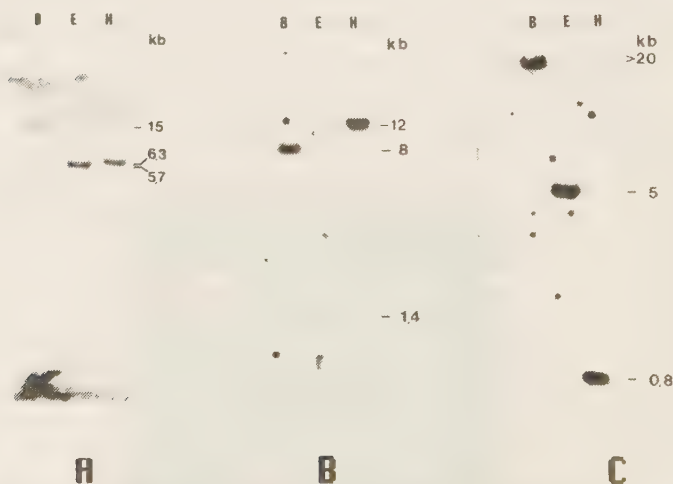


Abb. 4.5.- 11: Southern-Blot-Analysen von BL 64 DNA mit den Plasmiden:

A: pH 235/1; B: pH 264/1; C: pH 267/1 (B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß insgesamt ca. 74 kb, vom Startpunkt der *c-myc* Expression an gerechnet (Abb. 4.5.-12), des 3'-*c-myc* Genbereichs isoliert und kartiert werden konnten, unter der Annahme, das Allel mit der Duplikation sei transloziert. Der Bruchpunkt konnte jedoch mit diesem Bereich nicht erfaßt werden, wie durch 'Southern-Blot'-Analysen genomischer BL 64 - DNA bewiesen wurde. Die Strukturen der Phagen 64/15 und 64/16, sowie der Vergleich Eco RI geschnittener BL 64 - und IARC 549 - DNA in einer 'Southern-Blot'-Analyse zeigten, daß ein Polymorphismus bezüglich der Eco RI - Schnittstellen vorlag, der nicht in Zusammenhang mit der Translokation der BL 64 - Zellen stand.

4.6. Analyse des Bruchpunktes auf Chromosom 8q⁺

4.6.1. Eingrenzung des Bruchpunktes

Da die Analyse des 3'-c-myc Genbereichs nicht zur Identifizierung des Bruchpunktes führte, wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Die von H. Hameister durchgeführte Analyse der BL 64 - Chromosomen ergab, daß auf Chromosom 8q⁺ C κ -Sequenzen und J κ -Sequenzen nachzuweisen waren. Da auch auf Chromosom 2, dem funktionellen κ -Allel, und Chromosom 2p⁺ J κ -Sequenzen gefunden wurden, war die Lage des Bruchpunktes im J κ -Bereich anzunehmen. Verschiedene Phagen, die beide κ -Allele der BL 64 - Zellen repräsentierten, wurden bereits in der Diplomarbeit (Hartl, 1984) isoliert.

Aus dem Phagen 64/03, der Bereiche des nicht funktionellen, translozierten Allels enthielt, wurde nach Spaltung mit den Enzymen Bam HI und Sac I das 2,3 kb große Fragment, das die J κ -Sequenzen enthielt, in einen pUC 12 - Vektor kloniert (durchgeführt von T. Dobner im Rahmen seines Praktikums) und nach Isolierung des Plasmids pT 49 weiter kartiert. Dieses Fragment wurde gewählt, da die Sac I - Schnittstelle noch im konservierten Teil des κ -Bereichs lag, die Bam HI - Schnittstelle jedoch nicht mehr mit der Keimbahnkonfiguration der DNA übereinstimmte. Die Kartierung ergab, daß ca. 600 bp von der Sac I - Schnittstelle entfernt eine im J κ -Bereich lokalisierte Hpa I - Schnittstelle noch nachzuweisen war. Ungefähr 800 bp von der Sac I - Schnittstelle entfernt trat eine Acc I - Stelle neu auf, die nicht mit der embryonalen DNA-Struktur dieses Bereichs übereinstimmte (Abb. 4.6.-1). Deshalb wurde der Acc I - Sac I Bereich sequenziert.

4.6.2. Klonierung und Sequenzierung des Bruchpunktes

Nach Spaltung des Plasmids mit dem Enzym Acc I wurde das 3,5 kb große Fragment, das den Vektor pUC 12 und das 800 bp große Sac I / Acc I - Fragment enthielt, aus einem Agarosegel isoliert und religiert. Aus diesem Plasmid wurde das insertierte Fragment mit den Enzymen Eco RI und Hind III herausgespalten, über ein Agarosegel isoliert und anschließend mit dem Enzym Hpa I gespalten, das glatte Enden erzeugt. Dabei entstanden ein 0,6 kb großes Eco RI / Hpa I - und ein

0,2 kb großes Hind III / Hpa I - Fragment, in dem der Bruchpunkt vermutet wurde. Nach Hitzeinaktivierung der Enzyme, wurden das 0,2 kb große Hind III / Hpa I - sowie das Ausgangsfragment (0,8 kb, E/H) in mit Hind III / Sma I (Sma I erzeugt glatte Enden) bzw. E/H - geschnittene M13 mp10 - Vektoren kloniert (Klonierungsschema: Abb. 4.6.-2). Dadurch war eine Sequenzierung von der Hind III - Stelle her, die der Acc I - Stelle entsprach, möglich.

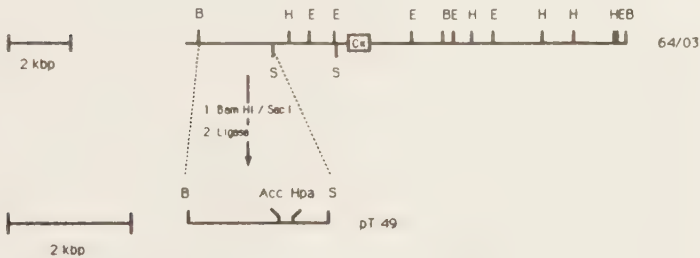


Abb. 4.6.-1: Subklonierung von pT 49
(Acc: Acc I; B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; Hpa: Hpa I; S: Sac I)



Abb. 4.6.-2: Subklonierungs- und Sequenzierungsschema des Bruchpunktes
(Symbole wie in Abb. 4.6.-1; Schnittstellen des Polylinkers sind in Kreisen dargestellt)

die sich zwei Gruppen zuordnen ließen: der Phage 64/09 setzt den 5'-Bereich des Phagen 64/03 fort, er enthält noch weitere Chromosom 8 - Anteile (Abb. 4.7.-1).

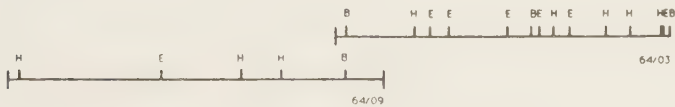


Abb. 4.7.-1: Struktur des Phagen 64/09 im Vergleich zu 64/03
(B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III)

Die Phagen 64/10, 64/11 und 64/13 stellen ihrer Struktur nach die erwartete dritte Gruppe dar (Abb. 4.7.-2). Die Länge des mit λ hybridisierenden 7,5 kb Bam HI / Bam HI - Fragments des Phagen 64/13 entsprach der dritten Bande, die bei Hybridisierungen genomischer BL 64 - DNA mit einer λ -spezifischen Probe zu beobachten war, nachdem die beiden anderen Banden (8 kb und 9 kb) bereits dem funktionellen und dem nichtfunktionellen Allel zugeordnet werden konnten. Deshalb konnte angenommen werden, daß das neue Fragment den reziproken Bruchpunkt enthält.

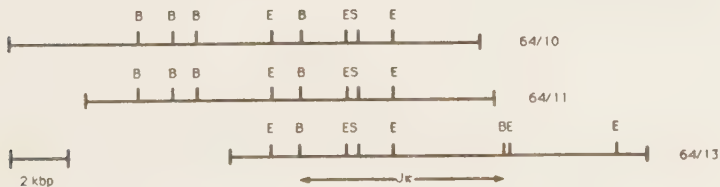


Abb. 4.7.-2: Struktur der mit der λ -Probe isolierten Phagen
(Symbole wie in Abb. 4.7.-1; S: Sal I; der Pfeil gibt die Lage des Bam HI - Fragmente an, das in pH 208/1 subkloniert wurde)

4.7.2. Eingrenzung des Bruchpunktes

Um den Bruchpunkt auf dem 7,2 kb großen Fragment genauer lokalisieren zu können, wurde der Phage 64/13 mit dem Enzym Bam HI gespalten. Der Spaltansatz wurde nach Hitzeinaktivierung des Enzyms direkt zur Klonierung des 7,2 kb großen Fragments unter Verwendung des Vektors pUC 12 herangezogen. Die Klonierung wurde durch Spaltung von Schnellaufschluß-DNA einiger der Klone mit dem Enzym Bam HI kontrolliert. Präparativ isolierte Plasmid DNA wurde zur Kartierung des positiven KLons pH 208/1 verwendet. Das Spaltmuster zeigte, daß in dem Fragment eine einzige Eco RV - Schnittstelle enthalten war (Abb. 4.7 - 3). Im J κ -Bereich, genauer im J3-Gen, ist ebenfalls eine Eco RV - Schnittstelle an Position 948 (Hieter et al., 1982) lokalisiert. Von dem zur Kartierung verwendeten Gel wurden zwei Nitrocellulosefilterabzüge angefertigt (3.6.3.), von denen einer gegen eine markierte J κ -Probe hybridisiert wurde. Aus der Autoradiographie war zu erkennen, daß die Fragmente, die um die Eco RV-Stelle lagen oder diese enthielten, mit dieser Probe hybridisierten. Da in der veröffentlichten Sequenz der Keimbahn-DNA weder die Pst I - noch die Eco RI - Schnittstellen, die in pH 208/1 neben der Eco RV-Stelle liegen, vorhanden waren, konnte davon ausgegangen werden, daß der Bruchpunkt in diesem Bereich lag.

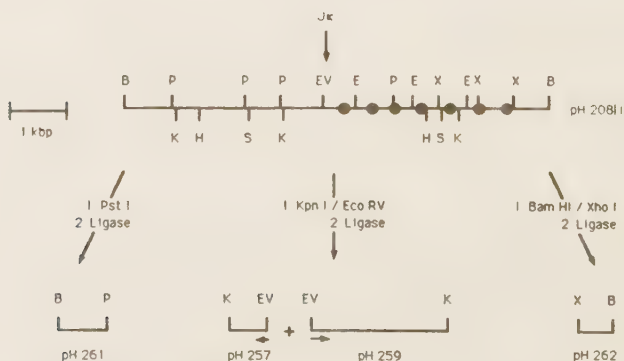


Abb. 4.7 - 3: Subklonierungs- und Sequenzierungsschema von pH 208/1 ausgehend (B: Bam HI; E: Eco RI; EV: Eco RV; H: Hind III; K: Kpn I; P: Pst I; S: Sal I; X: Xho I; Repetitionen sind durch Punkte dargestellt)

Die Hybridisierung des zweiten Filters mit radioaktiv markierter BL 64 - DNA ergab, daß der 3'-Bereich (von der Eco RV - Stelle aus betrachtet) vollständig von Repetitionen frei war. Der 5'-Bereich hingegen war mit Repetitionen durchsetzt, es konnten nur zwei kurze repetitionsfreie Bereiche gefunden werden. Das 0,7 kb große Bam HI / Xho I - Fragment wurde nach seiner Isolierung über ein Agarosegel (0,9%) in einen pUC 12 - Vektor kloniert, der mit den Enzymen Bam HI und Sal I vorbehandelt worden war (Sal I erzeugt Xho I kompatible Enden). Der Klon pH 262, der dieses Fragment enthielt (Abb. 4.7.-3), wurde zur Hybridisierung Bam HI gespaltener genomischer BL 64 - und IARC 549 - DNA verwendet. Aus der Autoradiographie waren zwei positive Banden der Größen 6 kb und 7,5 kb bei BL 64 zu erkennen, jedoch nur eine Bande (6 kb) bei IARC 549, die doppelte Intensität besaß (Abb. 4.7.-4).



Abb. 4.7.-4: Southern-Blot-Analyse von BL 64 - und IARC 549-DNA mit dem Plasmid pH 262/1 (B: Bam HI; linke Spur: BL 64; rechte Spur: IARC 549)

Damit konnte die Existenz des 7,5 kb großen Fragments auch auf genomischer Ebene, spezifisch für BL 64, nachgewiesen werden. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, daß mit pH 208/1 der reziproke Bruchpunkt isoliert worden war. Nach Spaltung von pH 208/1 mit dem Enzym PstI und nachfolgender Religierung wurde das Plasmid pH 261 erhalten, das Sequenzen von Chromosom 2 enthielt (Abb. 4.7.-3). Vorläufige Ergebnisse von *in-situ*-Hybridisierungen an Chromosomen einiger Burkitt Lymphom - Linien zeigten, daß pH 262/1 von Chromosom 8 und pH 261 von Chromosom 2 herzuleiten sind (S. Adolph, pers. Mitteilung).

4.7.3. Sequenzierung des reziproken Bruchpunktes

Aus den Ergebnissen der Kartierung war es nicht möglich, die Lage und die genaue Entfernung des Bruchpunktes bezüglich der Eco RV - Schnittstelle festzulegen. Eine Sequenzierung auf einfache Art, wie in 4.6.3. beschrieben, war deshalb nicht möglich. Um die Orientierung der J κ -Sequenzen, und damit des Bruchpunktes, innerhalb von pH 208/1 festzulegen, wurde dieses Plasmid mit den Enzymen Eco RV und Kpn I gespalten. Die dabei entstehenden 2,3 kb und 0,6 kb großen Fragmente wurden in mit Kpn I und Sma I gespaltenen pUC 18 - Vektor kloniert (Eco RV erzeugt Sma I kompatible Enden). Mit der Sequenzierung von der Sma I (Eco RV)-Stelle aus sollte die Orientierung der J κ -Gene und damit des Bruchpunktes festgestellt werden (Abb.4.7.-3). Die Sequenzen (nicht einzeln dargestellt) ergaben, daß die Eco RV - Stelle mit der des J κ -Bereichs identisch war. Der Bruchpunkt (der zwischen J5 und J4 lag) war der Orientierung nach in dem repetitionshaltigen Teil von pH 208/1 zu erwarten, der nichtrepetitive Teil entsprach dem Anteil von Chromosom 2.

Da der Bruchpunkt innerhalb des Eco RI / Pst I - Fragments zu erwarten war (4.7.2.), wurde das 1,8 kb große Pst I / Pst I - Fragment, das die Eco RV - Schnittstelle enthielt, aus dem Plasmid pH 208/1 herausgespalten und über ein Agarosegel (0,8%) isoliert. Je 3 μ g dieses Fragments wurden mit den Restriktionsenzymen Alu I, Rsa I und Sau 3A I gespalten. Durch die Spaltung des Fragments mit verschiedenen Enzymen, die vier Basenpaare als Erkennungssequenz

besitzen, sollte erreicht werden, daß kurze überlappende Subfragmente entstanden, die zur Sequenzierung geeignet waren und deren einzeln bestimmte Sequenzen anschließend miteinander verglichen und zusammengesetzt werden konnten.

Die Fragmente, die bei den Spaltungen entstanden, wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (1,6%) und einzeln isoliert. Die so getrennten Fragmente wurden zunächst in folgende pUC 12 - Vektoren kloniert: Alu I - und Rsa I - Fragmente in Sma I gespaltenen pUC 12; Sau 3A - Fragmente in Bam HI gespaltenen pUC 12. Dabei wurde zunächst vernachlässigt, daß Randfragmente, die an einem Ende Pst I - Schnittstellen enthielten, so nicht kloniert werden konnten. Wurden bei einigen dieser Klonierungsansätze sehr wenige oder keine Klone erhalten, so wurden die entsprechenden Fragmente erneut unter Verwendung Pst I / Sma I bzw. Bam HI / Sma I - gespaltenen pUC 12 - Vektors kloniert. Dadurch konnten einige der Randfragmente isoliert werden. Die einzelnen Fragmente wurden in beide Richtungen sequenziert (3.9.2.) und die Sequenzen zusammen mit den Sequenzen der Plasmide pH 257 und pH 259 mittels des MicroGenie Programms (Beckman) im IBM- XT personal computer verglichen und, soweit dies möglich war, zusammengesetzt (Abb. 4.7.-5).

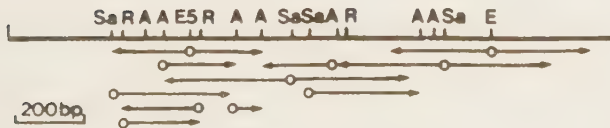


Abb. 4.7.-5: Sequenzierungsschema des Bruchpunktes
(A: Alu I; E: Eco RI; EV: Eco RV; R: Rsa I; Sa: Sau 3A I; die Pfeile geben die Richtung und die Länge der ermittelten Sequenzen wieder)

Mit dieser Methode war es möglich, zusammenhängend die Sequenzen eines 1,3 kb langen DNA-Bereiches des 1,8 kb großen Ausgangsfragmentes zu erhalten. Dieser Bereich enthielt die J κ -Sequenzen, die von Position 740 bis Position 1560 enthalten waren. Nach Position 1560 konnte keine Ähnlichkeit der publizierten Sequenz mit der oben ermittelten Sequenz festgestellt werden (Abb. 4.7-6).

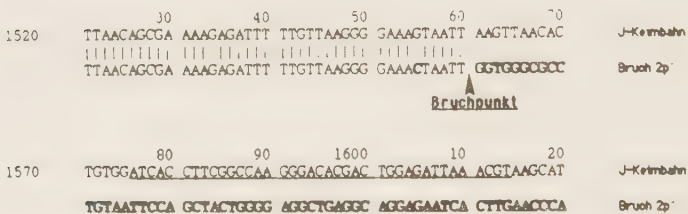


Abb. 4.7.-6: Sequenz des Bruchpunktes im Vergleich zur J-Keimbahnsequenz (Homologien sind durch senkrechte Striche verdeutlicht, die abweichende Sequenz ist im Fettdruck dargestellt)

4.8. Analyse der Sequenzen beider Bruchpunkte

4.8.1. Vergleich der Sequenzen

Die Sequenz des Bruchpunktes auf Chromosom 8q⁺ wurde mit der embryonalen Sequenz verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß das J δ -Gen mit seinem kodierenden Bereich vollständig auf Chromosom 8 transloziert wurde. Neben dem kodierenden Teil des Gens wurde noch ein kurzer 5'-Bereich transloziert, der die Heptamersequenz und die Basen bis zum Beginn der Nonamersequenzen des J δ -Gens bei Position 1544 (Hieter et al., 1982) enthielt. Eine Vergleich der Sequenz mit der MicroGenie Sequenzbank (Beckman) zeigte, daß die neue Sequenz stark homolog war zu der Sequenz des Klon Blur 11, einem Mitglied der repetitiven menschlichen Alu - Familie (Abb. 4.8.-1). Neben den zur Alu - Familie homologen Sequenzen waren noch 76 bp nichtrepetitiver Art zu erkennen, in diesem Teil der Sequenz war eine zur Heptamersequenz der J κ -Gene vollständig homologer Bereich enthalten (Abb. 4.8.-1).

Die Sequenz des Bruchpunktes auf Chromosom 2p⁻ zeigt im Vergleich mit der embryonalen J κ -Sequenz, daß der reziproke Bruchpunkt im erwarteten Bereich zwischen J4 und J5 lag, da die beiden Sequenzen bis zum Intronbereich zwischen J4 und J5 homolog waren. Allerdings endete die J κ -homologe Sequenz nicht exakt an der Position 1545, wie von der Struktur des Chromosom 8q⁺-Bruchpunktes her zu erwarten gewesen wäre, sondern erst an Position 1560. Eine Ausnahme in der Homologie bildet die Base an Position 1555, an der ein G→C Austausch stattfand (Abb. 4.8.-2). Der zur J κ -Sequenz nicht homologe Teil entsprach seiner Homologie nach ebenfalls dem Klon Blur 11 aus der Alu - Familie. Aus einem Vergleich der Teile beider Sequenzen, die zu dem Klon Blur 11 homolog waren, war zu erkennen, daß der Bruch auf Chromosom 8 ebenfalls unpräzise erfolgte. Während der Translokation wurden 21 bp aus dem der Alu-Familie entsprechenden Bereich deletiert.

4.8.2. Die Rolle der V-J-Rekombinationssignale bei der Entstehung der Translokation

Wie bereits oben gezeigt wurde, liegt der Bruchpunkt im J κ -Bereich genau zwischen den Heptamer- und Nonamersequenzen, die als Erkennungssequenzen der V-J-Umlagerung dienen. Zudem war in dem Chromosom 8 - spezifischen Teil der Sequenz (Bruchpunkt 8q⁺) eine Heptamersequenz zu erkennen. Im durch die Translokation deletierten Teil der Alu-Sequenz befand sich exakt zu Beginn der Deletion eine Sequenz, die in acht Basenpaaren zu einer Nonamersequenz homolog war. An Position 9 dieser Box befand sich statt dem im Nonamer konservierten C ein T, das im Falle einer Basenpaarung zwischen den Boxen der beiden Chromosomen zu einer energetisch schwachen G-T Paarung geführt hätte. Die Präsenz von Sequenzen in der unmittelbaren Nähe des Bruchpunktes auf Chromosom 8, die fast vollständig den V-J-Rekombinationssignalen entsprechen, sowie die Tatsache, daß der Bruchpunkt auf Chromosom 2 genau zwischen diesen Rekombinationssignalen liegt, deuteten eine Beteiligung des Rekombinationssystems bei der Translokation an.

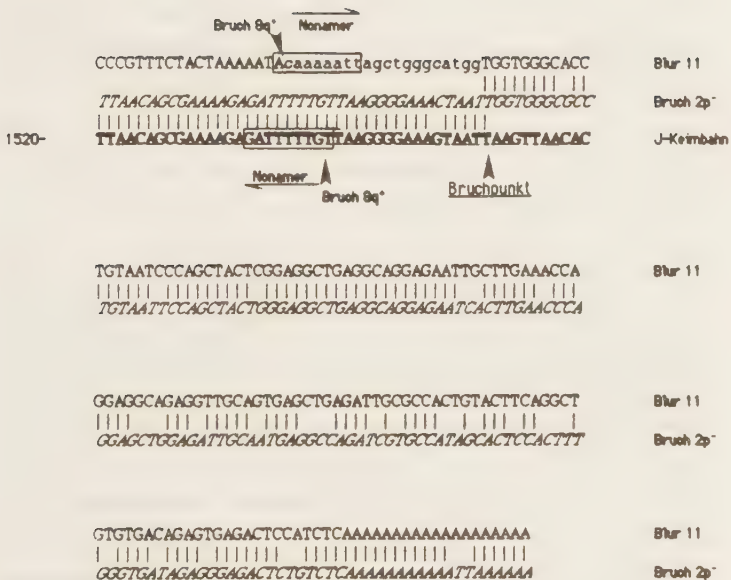


Abb. 4.8.-2: Sequenzanalyse des Bruchpunktes auf Chromosom 2p-

kursiv: Sequenz des Bruchpunktes

normal: Sequenz des Klonen Blur 11 aus der Alu-Familie; in kleinen Buchstaben ist der deletierte Teil dargestellt

fett: J-Keimbahnsequenz; der duplizierte Teil ist eingegrenzt. Durch senkrechte Striche sind die Homologien verdeutlicht. In den Sequenzen sind jeweils Lage und Orientierung der Heptamer- und Nonamerboxen angegeben.

5. Diskussion

5.1. Ein neuer Polymorphismus des c-myc Gens

Polymorphismen verschiedener Gene sind bekannt, besonders funktionelle Polymorphismen, wie sie zum Beispiel im MHC - Komplex auftreten. Gut charakterisiert sind auch Polymorphismen von Schnittstellen bestimmter Restriktionsenzyme, die mit definierten Krankheitsbildern einhergehen. Sie dienen in diesen Fällen als Marker von Chromosomenabschnitten und werden als Indikatoren spezifischer Krankheiten verwendet. Die Kenntnis solcher Zusammenhänge ist für eine pränatale Diagnostik oder gar eine eventuelle Gentherapie von Bedeutung (Winnacker, 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine strukturelle Änderung des c-myc Gens beschrieben werden. Die Analyse genomischer BL 64 - DNA durch 'Southern Blot'-Hybridisierung zeigte unter Verwendung einer Probe, die das dritte Exon des c-myc Gens enthielt, bei Spaltungen mit den Enzymen Eco RI, Hind III und Xba I neben den Banden, die aufgrund der publizierten Daten erwartet wurden, zusätzliche Banden mit halber Intensität. Durch eine genaue Kartierung der überlappenden Phagen 64/06 und 64/08, die das veränderte Allel repräsentierten, konnte gezeigt werden, daß die Duplikation einen 9 kb großen Bereich betraf, der das zweite und dritte Exon des c-myc Gens sowie einen 3'-Bereich enthielt. Der Beginn der Duplikation lag bei Position 4184 (Gazin et al, 1984) kurz vor Beginn des zweiten Exons, wie die Sequenzierung dieses Bereichs ergab.

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Duplikation und dem Translokationsereignis bestand, die unter Umständen zur Entwicklung des BL 64 - Tumors beigetragen hatte, wurde eine vergleichende 'Southern-Blot'-Analyse der Zelllinien BL 64 und IARC 549 durchgeführt. Die Zelllinie IARC 549 wurde von G. Lenoir, Lyon durch Immortalisierung peripherer Lymphozyten des BL 64 - Patienten etabliert und zur Verfügung gestellt. Dazu wurde DNA der Zelllinie EW 12 und der dazugehörenden Vergleichslinie IARC 316 mit untersucht, da bei EW 12 ein

Hybridisierungsmuster beobachtet worden war, das dem von BL 64 entsprach (J-M Bechet, pers. Mitteilung). Anhand der Hybridisierung mit der 3'-c-myc Probe konnte dieselbe strukturelle Änderung dieser vier Zelllinien, die Tumorzellen und normale Zellen zweier Patienten mit unterschiedlichen Tumoren repräsentierten, nachgewiesen werden. Eine für BL 64 - Zellen translokationsbedingte Duplikation konnte daher ausgeschlossen werden.

Kryptische Promotoren, die im ersten Intron des c-myc Gens liegen und deren Benutzung in einigen Burkitt-Lymphomen mit einer t(8;14) Translokation nachgewiesen wurde (Bernard et al., 1983), waren daher von der Duplikation nicht betroffen. Da weder zusätzliche c-myc - spezifische RNA-Spezies noch eine transkriptionell aktive Region zwischen dem dritten Exon des vollständigen c-myc Gens und dem Beginn der Duplikation nachgewiesen werden konnte, war anzunehmen, daß die Duplikation keinen Einfluß auf die c-myc Gen Expression hatte. Zwar wurde in BL 64 - Zellen eine erhöhte Menge an c-myc - spezifischer RNA gefunden, jedoch schloß der Vergleich mit der RNA-Expression der Linie IARC 549, einer immortalisierten lymphoblastoiden Linie des BL 64 - Patienten, einen Zusammenhang zwischen Erhöhung der Transkriptionsrate und Duplikation aus. Denn die Expression der c-myc RNA in IARC 549 war mit anderen Normalwerten vergleichbar, obwohl auch in IARC 549 die Duplikation nachweisbar war.

Auch eine aufgrund dieser Ergebnisse durchgeführte Studie der Familienmitglieder beider Patienten (G. Lenoir et al., 1986) deutete an, daß kein Zusammenhang zwischen der partiellen Duplikation des c-myc Gens und einem akut erhöhten Risiko zur Entwicklung von Tumoren bei Trägern dieses Polymorphismus besteht, obwohl eingeräumt werden muß, daß die Zahl der Untersuchungen (ca. 40) für eine generelle Aussage noch nicht ausreicht. Es ist jedoch nun möglich, anhand dieses genetischen Markers in größerem Umfang angelegte Studien durchzuführen.

5.2. Vergleich der beiden c-myc Allele

Eine Unterscheidung des translozierten c-myc Gens vom normalen Gen ist nur in den Fällen leicht möglich, in denen der unmittelbare Bereich des c-myc Gens starke, durch die Translokation verursachte, strukturelle Änderungen aufweist, so wie es bei den meisten Burkitt-Lymphomen, die t(8;14) Translokationen besitzen, der Fall ist. Eine Unterscheidung in den Fällen, in denen der Bruchpunkt sehr weit vom c-myc Gen entfernt lokalisiert ist, können die Allele nur durch aufwendige experimentelle Ansätze getrennt werden. Möglichkeiten dazu sind die mechanische Trennung nach Fluoreszenz-Aktivierung der Chromosomen oder die biologische Trennung über Zellhybride.

Der in 5.1 diskutierte Polymorphismus des c-myc Gens der BL 64 - Zellen ermöglichte eine einfache Unterscheidung der c-myc Allele, obwohl der Bruchpunkt der t(2;8) Translokation der BL 64 - Zelllinie weit vom c-myc Gen entfernt liegt. Der Vergleich beider Allele durch eine Sequenzanalyse sollte einen Hinweis darauf erbringen, welches der Allele transloziert worden war, da bereits in einigen Fällen das Auftreten von Punktmutationen im translozierten c-myc Gen beobachtet worden war. Die Ursache solcher Mutationen wird in dem Mutationsmechanismus vermutet, der am Immunglobulinort wirksam ist, und der nach der Translokation des c-myc Gens in diesen Bereich auch auf das c-myc Gen einen Einfluß haben könnte. Es war deshalb von Interesse am Beispiel einer t(2;8) Translokation, in der beide Genorte durch eine große Distanz getrennt sind, zu untersuchen, ob dieser Mechanismus noch wirksam war.

Dazu wurde ein 1 kbp großer Bereich des c-myc Gens ausgewählt, der den Promotorbereich, das erste Exon und einen Anteil des ersten Introns enthielt. Dieser Bereich schien deshalb geeignet zu sein, da bei Burkitt-Lymphomen die Translokation oft eine teilweise oder vollständige Trennung des ersten Exons vom restlichen Gen bewirkt, ohne daß jedoch die Lebensfähigkeit der Zelle verloren geht. Ein Bruchpunkt in diesem Bereich wurde bis jetzt noch nicht beobachtet, daher scheint in Burkitt-Lymphomen eine Selektion gegen eine Veränderung dieses Bereichs oder eine Selektion für Veränderungen im Bereich des ersten Exons zu erfolgen, obwohl auch Mutationen im zweiten Exon toleriert werden können (Rabbitts et al., 1984).

Aufgrund der Sequenzanalyse konnten vier Punktmutationen gefunden werden, die spezifisch für das Allel waren, das die Duplikation enthielt. Mit einer Oligonukleotidprobe, die die Mutation an Position 2727 überspannte, konnte in Hybridisierungsexperimenten gezeigt werden, daß BL 64 - RNA, nicht jedoch RNA anderer Vergleichslinien mit dieser Probe hybridisierte. Da bekannt ist, daß in Burkitt-Lymphomen hauptsächlich das translozierte *c-myc* - Allel transkribiert wird und das Auftreten von Mutationen im *c-myc* Gen mit der Translokation korreliert ist, konnte angenommen werden, daß das strukturell veränderte Allel transloziert wurde.

In BL 64 Zellen wurde, wie bei allen Burkitt-Lymphomen, eine erhöhte Menge *c-myc* spezifischer RNA gefunden, die jedoch nicht auf eine Verlängerung der Halbwertszeit dieser RNA zurückzuführen war (Hartl und Lipp, 1986). Um zu überprüfen, ob die Mutation an Position 2727 auf die Expression des *c-myc* Gens einen Einfluß hatte, wurden die *c-myc* Promotoren beider Allele im CAT-Aktivitätstest verglichen. Dazu wurde ein jeweils 862 bp großes Pvu II - Fragment gewählt, das neben beiden *c-myc* Promotoren auch nahezu das vollständige erste Exon enthielt. Die Konstrukte wurden in verschiedene Zellen transfiziert und ihre Aktivitäten in Titrationsexperimenten verglichen. Sie vermittelten eine geringere Expression des CAT-Gens als der SV40 - Promotor, ein Unterschied zwischen beiden Konstrukten konnte jedoch nicht festgestellt werden. Somit mußte angenommen werden, daß zumindest die Mutation an Position 2727 keinen Einfluß auf die *c-myc* Expression hatte. Ein möglicher Einfluß der anderen Mutationen oder dieser Mutation im Zusammenhang mit Intronsequenzen konnte anhand dieser Experimente jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung des translozierten *c-myc* Gens wurde oft auf die Einwirkung der Immunglobulinen-Enhancer zurückgeführt. In einigen wenigen Fällen konnte dies gezeigt werden (z.B. Hayday et al., 1984). Bei den varianten Translokationen ist im allgemeinen der Enhancer jedoch sehr weit (> 70 kb) vom *c-myc* Gen entfernt. Ein Einfluß eines Ig-Enhancers über eine solche Distanz hinweg konnte noch nicht nachgewiesen werden. Andererseits sind für die effiziente Expression der Immunglobulingene nicht nur der Enhancer und der Promotor notwendig, sondern weitere DNA-Bereiche, die vor dem Promotor liegen und im Zusammenwirken mit den

angeführten Elementen zur Expression der Immunglobulingene führen. So konnte nicht ohneweiteres angenommen werden, daß der $\text{C}\kappa$ -Enhancer auf die *c-myc* Promotoren wirkt. Mit Konstrukten, die neben dem *c-myc* Gen mit den beiden Promotoren den $\text{C}\kappa$ -Enhancer enthielten, sowie analogen Konstrukten, in denen einer der Promotoren deletiert war, wurden im CAT-Test die Aktivitäten verglichen. Ein signifikanter Unterschied zu den Konstrukten ohne Enhancer konnte in keinem Fall festgestellt werden. Somit scheinen andere Faktoren für die erhöhte *c-myc* Expression in den BL 64 Zellen verantwortlich zu sein, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Expression des translozierten *c-myc* Gens im Chromatin der BL 64 - Zellen von weiteren Faktoren beeinflußt wird.

5.3. Chromosomale Analyse von BL 64

Ergebnisse der von H. Hameister, Ulm durchgeführten *in situ* -Hybridisierungen der BL 64 - Chromosomen mit $\text{V}\kappa$ -, $\text{J}\kappa$ -, $\text{C}\kappa$ - und *c-myc* - spezifischen Proben ergaben, daß der Bruch auf Chromosom 2p⁺ erfolgte, eine zusätzliche Southern-Blot-Analyse mit $\text{C}\kappa$ - und $\text{J}\kappa$ -Proben unterstützte diese Ergebnisse. Aufgrund der Orientierung des *c-myc* Gens bezüglich des Zentromers wurde der Bruchpunkt in 3'-Richtung des *c-myc* Gens vermutet.

Um die Entfernung des Bruchpunktes vom *c-myc* Gen auf Chromosom 8q⁺ zu bestimmen wurde der 3'-*c-myc* - Bereich untersucht. Dazu wurde die Technik des chromosomalen Wanderns angewandt, die es ermöglichte, vom *c-myc* Promotor aus einen ca. 74 kb großen Bereich des *c-myc* Gens zu charakterisieren (Abb. 5.3.-1). Neben dem Polymorphismus des *c-myc* Gens (51) konnte ein weiterer Polymorphismus bezüglich einer Eco RI - Schnittstelle gefunden werden, der jedoch nicht in Verbindung mit der Translokation der BL 64 - Linie zu bringen war, da dieselbe Veränderung auch bei einer 'Southern-Blot'-Analyse der Vergleichslinie IARC 549 zu beobachten war. Eine Zuordnung dieses Polymorphismus zu einem der beiden Allele war nicht möglich, da kein Phage isoliert werden konnte, der den Bereich vom *c-myc* Gen zu dieser Schnittstelle überspannte.

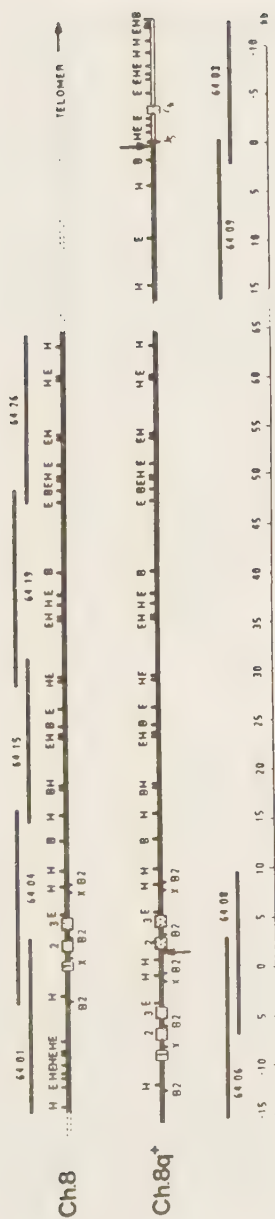


Abb. 5.3.-1: Zusammenfassung des isolierten 3'-C-myc Genbereiches (B: Bam HI; B2: Bgl II; E: Eco RI; H: Hind III; X: Xba I; der Duplikationsübergang ist durch den linken Pfeil, der Bruchpunkt auf Chromosom 8q⁺ durch den rechten Pfeil dargestellt; Abbildung entnommen aus: Hertl und Lipp, 1986)

Soweit eine Überprüfung möglich war, stimmte der charakterisierte Bereich der BL 64 - Linie mit veröffentlichten Daten überein (Sun et al., 1986). Eine Ausnahme bildete dabei eine zusätzliche Eco RI-Schnittstelle, die ca. 30 kb vom Promotor des c-myc Gens entfernt lokalisiert ist. Sie ist auf beiden Allelen enthalten, da keine zusätzliche Bande zu beobachten war, wie eine 'Southern-Blot'-Analyse mit pH 235/1 ergab. 'Southern-Blot'-Analysen mit Subfragmenten aus dem isolierten Bereich ergaben keinen Hinweis darauf, daß der Bruchpunkt erfaßt worden war. Mit dem charakterisierten, unmittelbaren 3'-Bereich des c-myc Gens und dem Phagen 64/09, der einen 3'-Bereich von Chromosom 8q* kurz vor dem Bruchpunkt enthielt, mußte der Bruchpunkt mindestens 88 kb vom c-myc Gen entfernt liegen.

Mit den repetitionsfreien Subklonen aus dem charakterisierten Bereich ist es nun möglich zu untersuchen, ob bei weiteren Burkitt-Lymphomen mit t(2;8) und t(8;22) Translokationen die Bruchpunkte in diesem Bereich liegen und ob eine Konzentrierung von Bruchpunkten an bestimmten Stellen in dem isolierten Bereich auftritt.

5.4. Struktur und Mechanismus der Translokation in BL 64

Die Sequenzanalyse des κ -Bereichs des Phagen 64/02 bestätigte die Annahme, daß dieser das funktionelle κ -Immunglobulingen enthielt. Ein V κ -Gen der Subgruppe I (Pech et al., 1984) war mit dem J4 - Gen unter Erhaltung des Leserahmens verbunden worden. Der Phage 64/03, der ebenfalls C κ - und J κ -Sequenzen enthielt, war demnach von Chromosom 8q* herzuleiten. Die Kartierung ergab, daß die kurz vor dem J5 - Gen liegende Hpa I - Schnittstelle noch vorhanden war, jedoch kurz davor eine Veränderung gegenüber der Stammliniensequenz auftrat. Durch Sequenzierung dieses Bereichs wurde gezeigt, daß ein Bruch zwischen dem J4 - und dem J5- Gen aufgetreten war, der genau innerhalb der V-J- Rekombinationssignale des J5 - Gens lag. Der neue DNA-Bereich zeigte keine Homologie zu dem J κ -Bereich, der Vergleich mit einer Sequenzdatenbank ergab, daß dieser Bereich homolog zur menschlichen Alu-Familie war. In dem nichtrepetitiven Teil der

Sequenz, die von Chromosom 8 abgeleitet wurde, lag eine Heptamerbox, so wie sie vor den Y- und J-Genen der leichten Ketten als Rekombinationssignal auftritt.

Mit einer J κ -Probe wurden aus einer BL 64 - Genbank Phagen isoliert, die der Struktur nach einer neuen Gruppe zugeordnet wurden, da sie weder dem funktionellen κ -Gen noch dem translozierten Chromosom 8q* entsprachen. Bei einer Hybridisierung genomischer BL 64 - DNA (Bam HI - gespalten) mit pH 262/1, einem Subklon dieser neuen Phagengruppe, wurden zwei Banden beobachtet. Eine der Banden entsprach der Größe nach der normalen Doppelbande, wie sie bei IARC 549 beobachtet wurde, die andere Bande war spezifisch für BL 64 und entsprach der Bande, die bei der 'Southern-Blot'-Analyse Bam HI - gespaltenen BL 64 DNA mit einer J κ -, nicht aber mit einer C κ -Probe zu sehen war. Aus diesen Resultaten konnte geschlossen werden, daß diese Phagen den J κ -Bereich enthielten, der auf Chromosom 2p⁺ lokalisiert war. Die Charakterisierung dieses J κ -Bereichs ergab, daß die Eco RV - Schnittstelle an Position 948 (Hieter et al., 1983) in pH 208/1 enthalten war. Nach einer genauen Kartierung wurde der Bereich, in dem der reziproke Bruchpunkt zu erwarten war, eingegrenzt und sequenziert. Anhand der Sequenzanalyse war zu erkennen, daß der Bruch ebenfalls zwischen J4 und J5 lag, allerdings erfolgte der Bruch nicht präzise, da 17 bp der J κ -Sequenz dupliziert vorlagen, wie ein Vergleich der J κ -Sequenzen beider Bruchpunkte ergab. Der duplizierte Bereich war Teil der Sequenz, die zwischen Heptamerbox und Nonamerbox des J5 - Gens lag. Die Sequenz, die von Chromosom 8 stammte, war ebenfalls zur Alu-Familie homolog. Die Translokation führte zu einer Deletion von 21 bp, wie beim Vergleich mit der Konsensus-Sequenz der Alu-Familie (Schmid und Jelinek, 1982) zu erkennen war. Der Bruchpunkt auf Chromosom 8q* lag damit genau in der A-reichen Region am Ende der ersten repetitiven Einheit der Alu-Sequenz, die aus zwei zueinander stark homologen Blöcken besteht. Diese A-reiche Region, die konservierter Bestandteil der Konsensus-Sequenz ist, enthält ein fast perfektes Homologes zur Nonamerbox der Y-J-Rekombinationssignale. Auch in anderen Fällen konnten bereits Umlagerungen beschrieben werden, die in einer Alu-Repetition erfolgten. Illegitime Rekombination innerhalb von Alu-Sequenzen führte

in vier Fällen zu Thalaessemien (Orkin and Michelson, 1980; Jagadeeswaran et al., 1982; Ottolenghi and Giglioni, 1982; Vanin et al., 1983) und in einem Fall zu Veränderungen im LDL-Rezeptor (Lehrmann et al., 1985). Am Beispiel einer reziproken t(9,22) Translokation konnte der Bruchpunkt ebenfalls innerhalb von Alu-Sequenzen festgelegt werden (Heisterkamp et al., 1985).

Anhand der Homologien zur Heptamerbox auf Chromosom 8 und zur Nonamerbox innerhalb der A-reichen Region der Alu-Sequenz ließ sich ein Modell des Translokationsablaufes aufstellen (Abb. 5.4.-1). Obwohl die beiden Boxen auf Chromosom 8 durch 155 bp getrennt waren (anstatt 12, wie bei den V-Genen) könnte eine vorübergehende Stabilisierung eines Übergangskomplexes möglich gewesen sein. Der Übergangskomplex kam analog der V-J-Umlagerung durch Paarung der Chromosomen 8 und 2 über die Heptamer- und Nonamerboxen, unter Ausbildung einzelsträngiger Bereiche zustande. Die Struktur des Bruchpunktes auf Chromosom 8q⁺ kann nun mit einem Schnitt am TG/AC-Paar erklärt werden. Diese Hypothese wird durch den experimentellen Befund erhärtet, daß dieses Dinukleotidpaar ein bevorzugtes Substrat des Rekombinationssystems darstellt (Hope et al., 1986). Nach der Ligation des AT-Paares und dem Auffüllen des Einzelstrangbereiches wird genau die Struktur des Bruchpunktes auf Chromosom 8q⁺ erhalten.

Die Struktur des Bruchpunktes auf Chromosom 2p⁺ kann durch ein Verbinden des einzelsträngigen Bereiches von Chromosom 2 mit Chromosom 8 erklärt werden, wobei ein anschließendes Auffüllen dieses Bereiches und eine damit verbundene Verdrängung des Teils von Chromosom 8 zur Duplikation von 17 bp des J-Gens und Deletion von 21 bp der Alu-Sequenz führt. Der Ablauf, der zum Bruchpunkt auf Chromosom 2p⁺ führt, enthält einige Schritte, die nicht zu einer exakten Verbindung führen. Jedoch muß bedacht werden, daß das Rekombinationssystem auch *in vivo* nicht präzise arbeitet (Kelley et al., 1985; Seidman and Leder, 1980) und deshalb auch bei V-J-Umlagerungen zu vielen nichtfunktionellen Strukturen führt. Der Basenaustausch im duplizierten Bereich kann entweder rekombinationsbedingt oder nachträglich durch einen Mutationsmechanismus erfolgt sein, der im Immunglobulinbereich wirksam ist.

Dieses Modell gibt der perfekten Paarung von Heptamer- und Nonamerboxen den Vorzug vor der genauen Einhaltung des Abstandes - er beträgt in diesem Modell 155/23 b (anstatt 12/23) - zwischen den Boxen, so wie es in einem anderen Modell postuliert wird (Tsuijimoto et al, 1985). Analog dem Modell von Tsuijimoto konnten auch bei BL 64 drei perfekte Basenpaarungen unter Einhaltung des Abstandes von 12 b ausgebildet werden. Generelle Überlegungen, die Häufigkeit von Alu-Sequenzen beziehungsweise Translokationen betreffend, gaben jedoch dem hier angeführten Modell den Vorzug. Bedenkt man die hohe Zahl der Alu-Kopien im menschlichen Genom (ca. $3 \cdot 5 \times 10^5$), so müßten Translokationen in Alu-Sequenzen anstatt von V-J-Umlagerungen viel häufiger zu beobachten sein, da die Nonamerbox fester Bestandteil aller Alu-Kopien ist und im fixierten Abstand von 12 b ein Minimum von drei Basenpaarungen fast immer zu finden sein wird. Sicherlich würden viele dieser Translokation zum Tod der betroffenen Zelle führen, sodaß sie nicht zu entdecken wären. Jedoch die hohe Zahl der B-Zellen im Menschen und der damit verbundenen Häufigkeit von Umlagerungen ließen mehr chromosomale Aberrationen erwarten.

Das hier vorgestellte Modell berücksichtigt diese Überlegungen. Die geforderte perfekte Paarung zwischen den Heptamer- und Nonamerboxen setzt die Wahrscheinlichkeit einer Translokation von Immunglobulingenen in Alu-Sequenzen aus zwei Gründen herab. Erstens ist der Abstand zwischen den Boxen weitaus größer und führt deshalb wohl zu einer geringeren Stabilität des Übergangskomplexes (ein Argument, das für die unvollständige Paarung der Heptamerbox auch angeführt werden kann). Zweitens muß die Heptamerbox unabhängig von der Nonamersequenz und außerhalb der Repetition vorhanden sein. Für das Risiko einer Translokation während der V-J-Umlagerung spielt also in diesem Modell auch noch die Umgebung der Alu-Repetition eine wesentliche Rolle. Die Wahrscheinlichkeit beide Boxen gleichzeitig und in einem nicht allzu großen Abstand zu finden ist daher geringer als in dem Modell von Tsuijimoto. Damit ist auch das Risiko einer Translokation herabgesetzt, das in gut funktionierenden biologischen Systemen naturgemäß geringgehalten werden muß.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die strukturelle Umgebung des *c-myc* Gens der Burkitt-Lymphom-Linie BL 64 untersucht. Dazu wurden ca. 75 kb des unmittelbaren 3'-Genbereichs aus einer genomischen Genbank dieser Zelllinie isoliert und charakterisiert. Eine im Rahmen dieser Untersuchung festgestellte partielle Duplikation des *c-myc* Gens konnte als ein Polymorphismus nachgewiesen werden, der unabhängig von der t(2;8) Translokation der BL 64-Zellen in zwei algerischen Familien auftritt. Dieser Polymorphismus ermöglichte eine Unterscheidung der beiden *c-myc* Allele. Durch die Sequenzanalyse eines 1 kb umfassenden Bereichs beider Allele konnten im ersten Exon und ersten Intron des *c-myc* Gens, spezifisch für das Allel mit der Duplikation, vier Punktmutationen nachgewiesen werden. Der CAT-Aktivitätstest der Promotoren beider Allele zeigte keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivität bei den verwendeten Konstrukten. Ebenso konnte ein direkter Einfluß des C κ -Enhancers auf die *c-myc*-Promotoren durch CAT-Experimente ausgeschlossen werden.

Mit einer J κ -spezifischen DNA-Sonde wurden aus der BL 64 - Genbank rekombinante Phagen isoliert, die das funktionelle κ -Allel sowie die Bruchpunkte der Chromosomen 8q⁺ und 2p⁻ enthielten. Die Sequenzanalyse beider Bruchpunkte zeigte, daß auf beiden Chromosomen V-J-Rekombinationssignale in der unmittelbaren Nähe beider Bruchpunkte lokalisiert waren. Die Identifizierung dieser Sequenzen, sowie die Tatsache, daß durch die Translokation 21 bp der Chromosom 8 - Sequenzen deletiert und 17 bp der J κ -Sequenzen dupliziert wurden, ermöglichten es, ein Modell des Translokationsablaufes aufzustellen. Dieses Modell gibt die Beteiligung der V-J-Rekombinationssignale am Translokationsereignis wieder.

7. LITERATUR

- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1985). The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**, 533-538.
- Albino, A.P., Le Strange, R., Oliff, A.I., Furth, M.E. & Old, L.J. (1984). Transforming *ras* genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity? *Nature* **308**, 69-72.
- Baer, R., Chen, K.-C., Smith, S.D. & Rabbitts, H.T. (1985). Fusion of an Immunoglobulin Variable Gene and a T Cell Receptor Constant Gene in the Chromosome 14 Inversion Associated with T Cell Tumors. *Cell* **43**, 705-713.
- Bangmann, C.I., Hung, M.-C. & Weinberg, R.A. (1986). Multiple Independent Activations of the *neu* Oncogene by a Point Mutation Altering the Transmembrane Domain of p185. *Cell* **45**, 649-657.
- Benton, W.D. & Davies, R.W. (1977). Screening lambda gt recombinant clones by hybridisation *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E. & Adams, J. (1983). Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumors. *EMBO J.* **2**, 2375-2383.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blanchard, J.-M., Piechazyk, M., Dani, C., Chambard, J.-C., Franchi, A., Pouyssegur, J. & Jeanteur, P. (1985). *c-myc* gene is transcribed at high rate in G₀-arrested fibroblasts and is post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature* **317**, 443-445.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Deniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Sheldon, E.L. & Smithies, O. (1977). Charon Phages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science* **196**, 161-169.
- BRL INC. (1980). M13 Cloning / 'Dideoxy' Sequencing Manual.
BRL INC. Gaithersburg, Maryland 20760
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-*myc* in Untreated Human Neuroblastomas Correlates with Advanced Disease Stage. *Science* **224**, 1121-1124.

- Butnick, N.Z., Miyamoto, C., Chizzonite, R., Cullen, B.R., Ju, G. & Skalka A.M. (1985). Regulation of the Human *c-myc* Gene: 5' Noncoding Sequences Do Not Affect Translation. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3009-3016.
- Capon, D.J., Chen, E.C., Levinson, A.D., Seeburg, P.H. & Goeddel, D.V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* **302**, 33-37.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H. (1985). Supercoil Sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Coffin, J., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Essex, M., Hardy, W.D., Rosenberg, N.E., Scolnick, E.M., Weinberg, R.A. & Vogt, P.K. (1981). Proposal for Naming Host Cell-Derived Inserts in Retrovirus Genomes. *J. Virol.* **40**, 953-957.
- Collins, S.T. & Groudine, M. (1982). Amplification of endogenous *myc*-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* **298**, 679-681.
- Cory, S., Gerondakis, S. & Adams, J.M. (1983). Interchromosomal recombination of the cellular oncogene *c-myc* with the immunoglobulin heavy chain locus in murine plasmacytomas is a reciprocal exchange. *EMBO J.* **2**, 697-703.
- Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J. & Calame, K. (1982). Mouse *c-myc* Oncogene Is Located on Chromosome 15 and Translocated to Chromosome 12 in Plasmacytomas. *Science* **218**, 1319-1321.
- Croce, C.M. (1985a). In: Mechanism of B Cell Neoplasia 1985
Editiones Roches, Basle, Switzerland
- Croce, C.M., Erikson, J., Huebner, K. & Nishikura, K. (1985b). Coexpression of Translocated and Normal *c-myc* Oncogenes in Hybrids Between Daudi and Lymphoblastoid Cells. *Science* **227**, 1235-1237.
- Dani, C., Blanchard, J.M., Piechazyk, M., El Sabouty, S., Marty, L. & Jeanteur, P. (1984). Extreme instability of *myc* mRNA in normal and transformed human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7046-7050.
- Dani, C., Mechti, N., Piechazyk, M., Lebleu, B., Jeanteur, P. & Blanchard, J.M. (1985). Increased rate of degradation of *c-myc* mRNA in interferon-treated Daudi cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4896-4899.
- DeFeo-Jones, D., Scolnick, E.M., Koller, R. & Dhar R. (1983). *Ras*-Related gene sequences identified and isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **306**, 707-709.
- Devine, J.M. (1986). Mechanism of activation of *HuBlym*-1 gene unresolved. *Nature* **321**, 437-438.
- Diamond, A., Cooper, G.M., Ritz, J. & Lane, M.-A. (1983). Identification and molecular cloning of the human *Blym* transforming gene activated in Burkitt's lymphomas. *Nature* **305**, 112-116.

- Dmitrovsky, E., Kuehl, W.M., Hollies, G.F., Kirsch, I.R., Bender, T.P. & Segal, S. (1986) Expression of a transfected human *c-myc* oncogene inhibits differentiation of a mouse erythroleukaemia cell line. *Nature* **322**, 748-750.
- Erikson, J., Nishikura, K., Ar-Rushdi, A., Finan, J., Emanuel, B., Lenoir, G., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1983). Translocation of an immunoglobulin κ locus to a region 3' of an unrearranged *c-myc* oncogene enhances *c-myc* transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7581-7585.
- Erikson, J., Finan, J., Tsujimoto, Y., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984) The Chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t(11,14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4144-4148.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983) A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984). Addendum to Feinberg and Vogelstein, 1983. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Fung, Y.K., Crittenden, L.B. & Kung, H.J. (1982). Orientation and position of avian leukosis virus DNA relative to the cellular oncogene *c-myc* in B-Lymphoma tumors of highly susceptible 151₅x7₂ chickens. *J. Virol.* **44**, 742-746.
- Fung, Y.K., Lewis, W.G., Kung, H.J. & Crittenden, L.B. (1983) Activation of the cellular oncogene *erbB* by LTR insertion: Molecular Basis for Introduction of Erythroblastosis by Avian Leukosis Virus. *Cell* **33**, 357-368.
- Gazin, C., Dupont de Dinechin, S., Hampe, A., Masson, J.-M., Martin, P., Stehelin, D. & Galibert, F. (1984). Nucleotide sequence of the human *c-myc* locus: provocative open reading frame within the first exon. *EMBO J.* **3**, 383-387.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. & Howard, B.H. (1982). Recombinant Genomes Which Express Chloramphenicol Acetyltransferase in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R. & Grosveld, G. (1984). Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, *bcr*, on Chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99.
- Haigler, H., Ash, J.F., Singer, S.J. & Cohen, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3317-3321.
- Hameister, H. & Adolph, S. (1986). Breakpoint determination of variant t(2;8) translocations in Burkitt lymphoma cell lines. *Hum. Genet.*, in press.

- Hann, S.R., Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R. & Eisenmann, R.N. (1983). Proteins Encoded by *v-myc* and *c-myc* Oncogenes: Identification and Localization in Acute Leukemia Virus Transformants and Bursal Lymphoma Cell Lines. *Cell* **34**, 789-798.
- Hann, S.R., Thompson, C.B. & Eisenman, R.N. (1985). *c-myc* oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* **314**, 366-369.
- Hartl, P. (1984). Isolierung von *c-myc*- und *Cx*- enthaltenden λ -Klonen aus Burkitt-Lymphomen mit 2;8 Translokationen.
Diplomarbeit, Institut für Biochemie München
- Hartl, P. & Lipp, M. (1986). Generation of a variant t(2;8) translocation of Burkitt's lymphoma by sitespecific recombination via the κ -light chain joining signals. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
- Hayday, A.C., Gillies, S.D., Saito, H., Wood, C., Wiman, K., Hayward, W.S. & Tonegawa, S. (1984). Activation of a translocated human *c-myc* gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* **307**, 334-340.
- Hayward, W.S., Neel, B.G. & Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular *onc* gene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukaemia. *Nature* **290**, 475-480.
- Heisterkamp, N., Stephenson, J.R., Groffen, J., Hansen, P., de Klein, A., Bartram, C.R. & Grosveld, G. (1983). Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239-242.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A. & Grosveld, G. (1985). Structural organization of the *bcr* gene and its role in the Ph⁺ translocation. *Nature* **315**, 758-761.
- Hieter, P.A., Maizel Jr., J.V. & Leder, P. (1982). Evolution of Human Immunoglobulin κ - J Region Genes. *J. Biol. Chem.* **257**, 1516-1522.
- Hope, T.J., Aguilera, R.J., Minie, M.E. & Sakano, H. (1986). Endonucleolytic Activity That Cleaves Immunoglobulin Recombination Sequences. *Science* **231**, 1141-1145.
- Ish-Horowitz, D. & Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucl. Acids Res.* **9**, 2989-2997.
- Jagadeeswaran, P., Tuan, D., Forget, B.G. & Weissman, S.M. (1982). A gene deletion ending at the midpoint of a repetitive DNA sequence in one form of hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Nature* **296**, 469-470.
- Kelley, D.E., Wiedemann, L.M., Pittet, A.-C., Strauss, S., Nelson, K.J., Davis, J., Van Ness, B. & Perry, R.P. (1985). Non-Productive Kappa Immunoglobulin genes: Recombinational abnormalities and other lesions affecting transcription, RNA processing, turnover, and translation. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1660-1675.

- Klein, G. & Klein, E. (1985). Evolution of tumors and the impact of molecular oncology
*Nature***315**, 311-315.
- Lachman, H.M. & Skoultschi, A.I. (1984). Expression of *c-myc* changes during differentiation of mouse erythroleukaemia cells. *Nature***310**, 592-594.
- Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.
*Nature***304**, 596-602.
- Leder, P., Tiemeier, D. & Enquist, L. (1977). EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms. The λ gtWES system.
*Science***196**, 175.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. & Taub, R. (1983). Translocations Among Antibody Genes in Human Cancer.
*Science***222**, 765-771.
- Leder, A., Pattengale, P.K., Kuo, A., Stewart, T.A. & Leder, P. (1986). Consequences of Widespread Deregulation of the *c-myc* gene in Transgenic Mice: Multiple Neoplasms and Normal Development. *Cell***45**, 485-495.
- Lehrman, M.A., Schneider, W.J., Südhof, T.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Russell, D.W. (1985). Mutation in LDL Receptor: Alu-Alu Recombination Deletes Exons Encoding Transmembrane and Cytoplasmic Domains. *Science***227**, 140-146.
- Lenoir, G. M., Lipp, M., Bechet, J. -M., Hartl, P., Bornkamm, G. W., Philip, T., Lavoue, M. -F., Ladjaj, Y. & Aboulola, M. (1986). A *c-myc* Gene Polymorphism in the Maghrebien Population: Constitutional Gene Duplication in Two Cancer Patients and Their Families. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Levy, L.S., Gardner, M.B. & Casey, J.W. (1984). Isolation of a feline leukaemia provirus containing the oncogene *myc* from a feline lymphosarcoma.
*Nature***308**, 853-856.
- Lieberman, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature***313**, 144-147.
- Lipp, M., Schilling, R., Wiest, S. & Hartl, P. (1986). Regulation of *c-myc* in Variant Chromosomal Translocations of Burkitt Lymphoma. In W. Tanner and D. Gallwitz (ed.), *Cell Cycle and Oncogenes*, Springer Berlin, Heidelberg, New York, S. 89-104.
- Lipp, M., Schilling, R., Wiest, S., Laux, G., & Bornkamm, G.W. (1987) Target sequences for *cis*-acting regulation within the dual promoter of the human *c-myc* gene.
Mol. Cell. Biol., in press.

- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, D.K. & Efstradiadis, A. (1978). The isolation of structural genes from libraries of eucariotic DNA. *Cell* **15**, 687-701.
- Marx, J.L. (1984). Oncogenes Amplified in Cancer Cells. *Science* **223**, 40-41.
- Morrison, D.A. (1979). Transformation and Preservation of competent bacteria cells by freezing. *Methods Enzymol.* **68**, 326-331.
- Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollies, G.F. & Minna, J.D. (1985). L-*myc*, a new *myc*-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* **318**, 69-73.
- Neil, J.C., Hughes, D., McFarlane, R., Wilkie, N.M., Onions, D.E., Lees, G. & Jarret, O. (1984). Transduction and rearrangement of the *myc* gene by feline leukaemia virus in naturally occurring T-cell leukaemias. *Nature* **308**, 814-820.
- Nusse, R. & Varmus, H.E. (1982). Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome. *Cell* **31**, 99-109.
- Nusse, R., van Oyen, A., Cox, D., Fung, Y.K.T. & Varmus, H. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (*int-1*) on mouse chromosome 15. *Nature* **307**, 131-136.
- Orkin, S.H. & Michelson, A. (1980). partial deletion of the α -globin structural gene in human α -thalassaemia. *Nature* **286**, 538-540.
- Ottolenghi, S. & Giglioni, B. (1982). The deletion in atype of $\alpha^0\beta^0$ -thalassaemia begins in an inverted Alu I repeat. *Nature* **300**, 770-771.
- Payne, G.S., Bishop, J.M. & Varmus, H.E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* **295**, 209-214.
- Pech, M., Jaenichen, H.-R., Pohlentz, H.-D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.-G. & Zachau, H.G. (1984). Organization and Evolution of a Gene Cluster for Human Immunoglobulin Variable Regions of the kappa Type. *J. Mol. Biol.* **176**, 189-204.
- Perry, R.P. (1983). Consequences of *myc* Invasion of Immunoglobulin Loci: Facts and Speculation. *Cell* **33**, 647-649.
- Peters, G., Brookes, S., Smith, R. & Dickson, C. (1983). Tumorigenesis by Mouse Mammary Tumor Virus: Evidence for a Common Region for Provirus Integration in Mammary Tumors. *Cell* **33**, 369-377.
- Piechazyk, M., Yang, J.-Q., Blanchard, J.-M., Jeanteur, P. & Marcu, K.B. (1985). Posttranscriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-*myc* mRNAs in murine plasma cell tumors. *Cell* **42**, 589-597.

- Potter, H., Weir, L. & Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of κ immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7161-7165.
- Prochownik, E.V. & Kukowska, J. (1986). Deregulated expression of c-*myc* by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* **322**, 848-850.
- Rabbitts, T.H., Forster, A., Hamlyn, P. & Baer, R. (1984). Effect of somatic mutation within translocated c-*myc* genes in Burkitt's lymphoma. *Nature* **309**, 592-597.
- Resnitzky, D., Yarden, A., Zipori, D. & Kimchi, A. (1986). Autocrine β -Related Interferon Controls c-*myc* Suppression and Growth Arrest during Hematopoietic Cell Differentiation. *Cell* **46**, 31-40.
- Rowley, J.D. (1983). Human oncogene locations and chromosomal aberrations. *Nature* **301**, 290-291.
- Sanger, F., Nickles, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schmid, C.W. & Jelinek, W.R. (1982). The Alu Family of Dispersed Repetitive Sequences. *Science* **216**, 1065-1070.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.-H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. & Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to *myc* cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* **303**, 245-248.
- Schwab, M., Ramsay, G., Alitalo, K., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Martinsson, T., Levan, G. & Levan, A. (1985). Amplification and enhanced expression of the c-*myc* oncogene in mouse SEWA tumor cells. *Nature* **315**, 345-347.
- Seidman, J.G. & Leder, P. (1980). A mutant immunoglobulin light chain is formed by aberrant DNA and RNA splicing events. *Nature* **286**, 779-783.
- Shen-Ong, G.L.C., Morse III, H.C., Potter, M. & Mushinski, J.F. (1986) Two Modes of c-*myb* Activation in Virus-Induced Mouse Myeloid Tumors. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 380-392.
- Sherr, C.J., Rettenmier, C.W., Sacca, R., Roussel, M.F., Look, A.T. & Stanley, E.R. (1985). The c-*fms* Proto-oncogene Product Is Related to the Receptor for the Mononuclear Phagocyte Growth Factor, CSF-1. *Cell* **41**, 665-676.
- Shih, C.-K., Linial, M., Goodenow, M.M. & Hayward, W.S. (1984). Nucleotide sequence 5' of the chicken c-*myc* coding region: Localization of a noncoding exon that is absent from *myc* transcripts in most avian leukosis virus-induced lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4697-4701.

- Shiness, D. & Bishop, J.M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J. Virol.* **31**, 514-521.
- Shilo, B.-Z. & Weinberg, R.A. (1981). DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6789-6792.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., Roe, B.A. & Canaani, E. (1986). Alternative Splicing of RNAs Transcribed from the Human *abl* Gene and from the *bcr-abl* Fused Gene. *Cell* **47**, 277-284.
- Slamon, D.J. & Cline, M.J. (1984). Expression of cellular oncogenes during embryonic and fetal development of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7141-7145.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Southern, E. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* **68**, 152-176.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. (1976). DNA related to transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
- Stern, D.F., Heffernan, P.A. & Weinberg, R.A. (1986). p185, a Product of the *neu* Proto-Oncogene, Is a Receptorlike Protein Associated with Tyrosine Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1729-1740.
- Swanstrom, R., Parker, R.C., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1983). Transduction of a cellular oncogene: The genesis of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2519-2523.
- Sümegi, J., Spira, J., Bazin, H., Szpirer, J., Levan, G. & Klein, G. (1983). Rat *c-myc* gene is located on chromosome 7 and rearranges in immunocytomas with the t(6;7) chromosomal translocation. *Nature* **306**, 497-498.
- Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. & Barbacid, M. (1983). Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-*ras*-1 locus by single point mutations. *Nature* **306**, 658-661.
- Sun, L.K., Showe, L.C. & Croce, C.M. (1986). Analysis of the 3' flanking region of the human *c-myc* gene lymphomas with the t(8;22) and t(2;8) chromosomal translocations. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4037-4050.
- Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. & Chang, E.H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**, 143-149.

- Taub, R., Kelly, K., Battey, J., Latt, S., Lenoir, G.M., Tantravahi, U., Tu, Z. & Leder, P. (1984). A Novel Alteration in the Structure of an Activated *c-myc* Gene in a Variant t(2;8) Burkitt-Lymphoma. *Cell***37**, 511-520.
- Thompson, C.B., Challoner, P.B., Neiman, P.E. & Groudine, M. (1985). Levels of *c-myc* oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature***314**, 363-366.
- Trent, J., Meltzer, P., Rosenblum, M., Harsh, G., Kinzler, K., Mashal, R., Feinberg, A. & Vogelstein, B. (1986). Evidence for rearrangement, amplification, and expression of *c-myc* in a human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***83**, 470-473.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984a). Molecular Cloning of the Chromosomal Breakpoint of B-Cell Lymphomas and Leukemias with the t(11;14) Chromosome Translocation. *Science***224**, 1403-1406.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984b). Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation. *Science***226**, 1097-1099.
- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1985). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature***315**, 340-343.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Liberman, T.A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E.L.V., Whittle, N., Waterfield, M.D. & Seeburg, P.H. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature***309**, 418-424.
- Vanin, E.F., Henthorn, P.S., Kioussis, D., Grosveld, F. & Smithies, O. (1983). Unexpected Relationships between Four Large Deletions in the Human β -Globin Gene Cluster. *Cell***35**, 701-709.
- Yarmus, H.E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* **18**, 553-612.
- Wallace, R.B., Jokusun, M.J., Suggs, S.V., Miyoski, K., Bhatt, R. & Itakura, K. (1981). A set of synthetic oligodeoxynucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322. *Gene***16**, 21-26.
- Wang, X.-F. & Calame, K. (1985). The Endogenous Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer Can Activate Tandem V_H Promoters Separated by a Large Distance. *Cell***43**, 659-665.
- Watson, D.K., Reddy, E.P., Duesberg, P.H. & Papas, T.S. (1983). Nucleotide sequence analysis of the chicken *c-myc* gene reveals homologous and unique coding regions

- by comparison with the transforming gene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2146-2150.
- Watt, R.A., Shatzman, A.R. & Rosenberg, M. (1985). Expression and characterization of the human c-*myc* DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 448-456.
- Weinberg, R.A. (1984). Cellular oncogenes. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 131-133.
- Winberg, G. & Hammarskjöld, M.-L. (1980). Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**, 253-264.
- Winnacker, E.-L. (1984). Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie Verlag Chemie, Weinheim, S. 389-391.
- Yuasa, Y., Gol, R.A., Chang, A., Chiu, I.-M., Premkumar Reddy, E., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. (1984). Mechanism of activation of an N-*ras* oncogene of SW-1271 human lung carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3670-3674.
- Zech, L., Gahrton, G., Hammarström, L., Juliusson, G., Mellstedt, H., Robert, K.H. & Smith, C.I.E. (1984). Inversion of chromosome 14 marks human T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **308**, 858-860.

LEBENS LAUF

Name	Peter Hartl
Geburtsdatum	06.04.1956
Geburtsort	Pfaffenhofen/Ilm
Eltern	Karl Hartl Rosa Hartl, geb. Kreitmayr
Familienstand	Ledig
1962 - 1966	Grundschule in München
1966 - 1976	Luitpold-Gymnasium in München (mathematisch-naturwissenschaftlich)
1976	Abitur
1976 - 1980	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1979	Diplomvorprüfung
1980 - 1982	Zivildienst in der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH (GSF)
1982 - 1983	Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
05.1983	Diplom-Hauptprüfung
05.1983 - 03.1984	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians- Universität München (Thema: "Isolierung und Charakterisierung von c-myc und Cκ- enthaltenden λ-Klonen aus Burkitt-Lymphomen mit 2;8 Translokationen")
04.1984 - 09.1986	Promotionsarbeit am selben Institut (Thema: "Analyse einer t(2;8) Translokation am Beispiel der Burkitt-Lymphom-Linie BL 64")

